

**Ekmeklik Buğday (*Triticum aestivum* L.) M₁
Hatlarında Anter Kültürü Yöntemi ile Doubled-
Haploid Genotiplerin Elde Edilme Olanakları
Soner Yiğit SARIER
Doktora Tezi
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Oğuz BİLGİN**

2016

T.C.
NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**EKMEKLİK BUĞDAY (*TRITICUM AESTIVUM* L.) M₁ HATLARINDA ANTER
KÜLTÜRÜ YÖNTEMİ İLE DOUBLED-HAPLOİD GENOTİPLERİN ELDE EDİLME
OLANAKLARI**

SONER YİĞİT SARIER

TARLA BİTKİLERİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN: DOÇ. DR. OĞUZ BİLGİN

TEKİRDAĞ-2016

Her hakkı saklıdır

Bu tez NKÜBAP tarafından NKUBAP.00.24.DR.13.01 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Doç. Dr. Oğuz BİLGİN danışmanlığında, Soner Yiğit SARIER tarafından hazırlanan “Ekmeklik Buğday (*Triticum aestivum* L.) M₁ Hatlarında Anter Kültürü Yöntemi ile Doubled-Haploid Genotiplerin Elde Edilme Olanakları” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Tarla Bitkileri Anabilim Dalı’nda Doktora Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Bayram SADE

imza :

Üye : Prof. Dr. Kayıhan Z. KORKUT

imza :

Üye : Prof. Dr. İsmet BAŞER

imza :

Üye : Prof. Dr. Aydın ÜNAY

imza :

Üye : Doç. Dr. Oğuz BİLGİN (Danışman)

imza :

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU
Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

EKMEKLİK BUĞDAY (*TRITICUM AESTIVUM* L.) M₁ HATLARINDA ANTER KÜLTÜRÜ YÖNTEMİ İLE DOUBLED-HAPLOİD GENOTİPLERİN ELDE EDİLME OLANAKLARI

Soner Yiğit SARIER

Namık Kemal Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Oğuz BİLGİN

Çalışmada iki farklı ekmeklik buğday ıleri hattı materyal olarak kullanılmıştır. Kontrol dahil sekiz farklı gamma ışını dozu (0, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 Gy) uygulanmış ekmeklik buğday mutant populasyonlarının anter kültürüne yanıtları araştırılmıştır. Bu amaçla erken tek çekirdekli dönemde ekmeklik buğday mutant populasyonlarından anterler W₁₄F besi ortamına aktarılmış, anter kültürüne yanıtın belirlenebilmesi için anterlerden gelişen kallus sayısı ile kalluslardan gelişen albino bitkicik ve yeşil bitkicik sayısı, yeşil bitkiciklerden elde edilen seraya aktarılan bitki sayısı, haploid bitki sayısı ve spontan doubled-haploid bitki sayısı özellikleri incelenmiştir. Araştırmada incelenen tüm anter kültürü özellikleri üzerine kullanılan genotiplerin (BSB ve FA) etkileri istatistiksel olarak önemsiz iken, genotiplere uygulanan gamma ışını dozları ve genotip x mutasyon dozu interaksyonları etkileri istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Kontrol dozuna göre mutasyon uygulamaları ile BSB genotipinde kallus sayısı, yeşil bitkicik sayısı, seraya aktarılan yeşil bitkicik sayısı ve spontan doubled-haploid bitki sayılarındaki artışlara rağmen albino bitkicik sayısı ve haploid bitki sayısında azalmalar belirlenmiştir. FA genotipinde ise kallus sayısı ve haploid bitki sayısı dışındaki diğer incelenen özellik için mutasyon dozlarının azaltıcı etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Araştırmada kullanılan iki ekmeklik buğday genotipinin gamma ışını uygulaması ile elde edilen mutant populasyonlarından besi ortamına aktarılan anterlerin %31.95 i kallus oluşturmuş, gelişen kallusların %22.31 inden albino bitkicik ve %31.36 sından yeşil bitkicik

gelişmiş, gelişen yeşil bitkiciklerden %42.97 si seraya aktarılmıştır. Seraya aktarılan yeşil bitkiciklerin %49.35 inden haploid bitki ve %11.55 inden spontan doubled- haploid bitki elde edilmiştir. Kontrol dozu dahil tüm gamma ışını mutasyon dozları arasında anterlerden gelişen kallus sayısı özelliği için %44.30 ile 150 Gy mutasyon dozu, kalluslardan gelişen albino bitkicik özelliği için %41,5 ile 150 Gy mutasyon dozu ve yeşil bitkicik özelliği için %31.01 ile 400 Gy mutasyon dozu, yeşil bitkiciklerden seraya aktarılan yeşil bitkicik özelliği için %53.68 ile 350 Gy mutasyon dozu, yeşil bitkiciklerden elde edilen haploid bitki sayısı özelliği için %74.68 ile 400 Gy mutasyon dozu ve spontan doubled-haploid bitki sayısı özelliği için %24.41 ile 150 Gy mutasyon dozu en yüksek başarı oranlarının elde edildiği dozlar olmuştur. Elde edilen sonuçlar, genotipin buğday anter kültüründe başarıyı etkileyen en önemli faktörlerden biri olduğu, anter kültüründen buğday ıslah programlarında yararlanabilmek için ıslah programındaki genotiplerin anter kültürüne reaksiyonlarının bilinmesi gerektiğini göstermektedir. Gamma ışını uygulaması ile ekmeklik buğdaylarda anter kültürüne yanıtın artırılacağı, buğday ıslahı programlarında mutasyon ıslahı ile anter kültürü tekniğinin kombine edilebileceği ve bu şekilde ıslah programının süresinin daha da kısaltılarak etkinliğinin artırılmasının mümkün olacağı sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Ekmeklik Buğday, Mutasyon, Anter Kültürü, Doubled-Haploid, Besi Ortamı

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

OBTAINING POSSIBILITIES OF DOUBLED-HAPLOID GENOTYPES USING ANTHIER
CULTURE METHOD IN M₁ LINES OF BREAD WHEAT (*TRITICUM AESTIVUM* L.)

Soner Yiğit SARIER

Namık Kemal University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Field Crops

Supervisor: Doç. Dr. Oğuz BİLGİN

In this study, two different bread wheat advanced lines are used as a material. The responses of mutant populations generated from eight different gamma ray dose (0, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 Gy) to anther culture was investigated. For this purpose, anthers from bread wheat mutant populations was transferred to W₁₄F culture medium for responses to anther culture in early single-core stage, and characters such as number of callus developed from anthers, number of albino and green plantlet developed from callus, number of plants transferred to greenhouse, number of haploids plants and spontaneous doubled-haploid plants obtained from green plantlet was evaluated for determining response to anther culture. In the research, while genotypes (BSB and FA) effects on all anther culture characters were not significant, the gamma-ray doses applied to genotype and genotype x mutation dose interactions effects were found statistically significant. Although increasing number of callus, number of green plantlet, number of green plant transferred to greenhouse and number of spontaneous doubled-haploid plants, it was determined decreasing for number of albino plantlet and number of haploid plant by mutation doses in comparison with control dose for BSB genotype. Mutation doses have a reducing effect on all characters except number of callus and number haploid plant for FA genotype. Callus was obtained from 31.95% of the anthers transferred to culture medium from the mutant populations obtained by gamma irradiation to the two bread wheat genotypes used in the study, 22.1% albino plantlet and 31.36% green plantlet were developed from callus and 42.97% of developed green plantlet

was transferred to greenhouse. Haploid plants and spontaneous doubled-haploid plants were obtained at 49.35% and 11.55% of the green plants transferred to the greenhouse, respectively. Among the all mutation doses including control dose, 150 Gy dose with 44.30% for number of callus improved from anthers, 150 Gy dose with 41.50% for number of albino plantlet from callus, 400 Gy dose with 31.01 for number of green plantlets, 350 Gy dose with 53.68 for number of green plants transferred to greenhouse, 400 Gy dose with 74.68% for haploid plants obtained from green plantlets and 150 Gy dose with 24.41% for number of spontaneous doubled-haploid plants were the doses gave the highest success rates. The obtained results indicate that genotype is one of the most important factors effecting success of the anther culture response in wheat, is necessary to know about responses of genotypes in breeding program to anther culture to benefit from anther culture in wheat breeding programs. It was reached concluded that gamma irradiation can increase the response to anther cultures in bread wheat, mutation breeding can be combined with anther culture technique in wheat breeding programs and in this way it will be possible to increase the effectiveness of the breeding program by further shortening the duration of the breeding program.

Keywords: Bread Wheat, Mutation, Anther Culture, Doubled-Haploid, Culture Media

İÇİNDEKİLER

Sayfa

| | |
|--|-----------|
| ÖZET..... | iv |
| ABSTRACT..... | vi |
| İÇİNDEKİLER..... | viii |
| ÇİZELGE DİZİNİ..... | x |
| ŞEKİL DİZİNİ..... | xii |
| RESİM DİZİNİ..... | xiii |
| KISALTMALAR..... | xiv |
| ÖNSÖZ..... | xv |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 2. KAYNAK ÖZETLERİ..... | 7 |
| 3. MATERYAL ve YÖNTEM..... | 15 |
| 3.1. Materyal..... | 15 |
| 3.1.1. Anaçlar ve genotiplerin özellikleri..... | 15 |
| 3.2. Yöntem..... | 16 |
| 3.2.1. Anter kültürü uygulaması..... | 16 |
| 3.2.1.1. Verici bitkinin seçilmesi..... | 17 |
| 3.2.1.2. Çiçektozu gelişim dönemi..... | 18 |
| 3.2.1.3. Ön soğuk uygulaması..... | 20 |
| 3.2.1.4. Besi ortamının hazırlanması..... | 21 |
| 3.2.1.5. Başakların sterilizasyonu..... | 23 |
| 3.2.1.6. Anterlerin izolasyonu ve besi ortamına aktarılması..... | 24 |
| 3.2.1.7. Anterlerin inkübasyonu..... | 25 |
| 3.2.1.8. Kallusların gelişimi ve rejenerasyon ortamına aktarılması..... | 25 |
| 3.2.1.9. Kalluslardan gelişen albino ve yeşil bitkiciklerin sayılarının belirlenmesi ve test tüplerine aktarılması..... | 26 |
| 3.2.1.10. Test tüplerinde gelişen bitkiciklerin toprak bulunan küçük tüplere aktarımı ve vernalizasyon yapılması..... | 33 |
| 3.2.1.11. Bitkilerde ploidi düzeyinin belirlenmesi..... | 35 |
| 3.2.1.12. Bitkilerin seraya aktarılması ve hasad edilmesi..... | 36 |
| 3.3. İncelenen Özellikler..... | 39 |
| 3.3.1. Kallus sayısı (adet)..... | 39 |
| 3.3.2. Albino bitkicik sayısı (adet)..... | 39 |
| 3.3.3. Yeşil bitkicik sayısı (adet)..... | 39 |
| 3.3.4. Seraya aktarılan bitki sayısı (adet)..... | 39 |
| 3.3.5. Haploid bitki sayısı (adet)..... | 39 |
| 3.3.6. Spontan doubled-haploid bitki sayısı (adet)..... | 39 |
| 3.4. Deneme Deseni ve Verilerin Değerlendirilmesi..... | 39 |
| 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA..... | 40 |
| 4.1. Ekmeklik Buğday Melez Populasyonlarında Anter Kültürüne Yanıt..... | 43 |
| 4.1.1. Kallus sayısı..... | 43 |
| 4.1.2. Albino bitkicik sayısı..... | 48 |
| 4.1.3. Yeşil bitkicik sayısı..... | 53 |
| 4.1.4. Seraya aktarılan bitki sayısı..... | 59 |
| 4.1.5. Haploid bitki sayısı..... | 65 |
| 4.1.6. Spontan doubled-haploid bitki sayısı..... | 71 |
| 4.1.7. Başarı oranlarının belirlenmesi..... | 77 |
| 4.1.7.1. Genotiplerin karşılaştırılması..... | 77 |
| 4.1.7.2. Mutasyon dozlarının karşılaştırılması..... | 82 |

| | |
|-----------------------------------|-----|
| 5. SONUÇ ve ÖNERİLER | 91 |
| 6.KAYNAKLAR | 92 |
| ÖZGEÇMİŞ | 102 |

ÇİZELGE DİZİNİ

| | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| Çizelge 3.1: Araştırmada materyal olarak kullanılan genotipler..... | 15 |
| Çizelge 3.2: Buğday genotiplerinin antrrelerinin aktrarıldığı başlangıç besi ortamı..... | 22 |
| Çizelge 3.3: Buğday genotiplerinin kalluslarının aktrarıldığı rejenerasyon besi ortamı..... | 26 |
| Çizelge 4.1: Kallus oranlarına göre aktarılan yeşil bitki, albino bitki, seraya aktarılan bitki haploid bitki ve spontan doubled- haploid bitki sayısı..... | 41 |
| Çizelge 4.1.1.1: Kallus sayısı özelliği için varyans analiz sonuçları..... | 45 |
| Çizelge 4.1.1.2: Kallus sayısı özelliğine ilişkin mutasyon doz ortalamaları ve önemlilikleri | 46 |
| Çizelge 4.1.1.3: Kallus sayısı özelliğine ilişkin genotip x doz interaksyonları ve önemlilikleri..... | 48 |
| Çizelge 4.1.2.1: Albino bitkicik sayısı özelliği için varyans analiz sonuçları..... | 50 |
| Çizelge 4.1.2.2: Albino bitkicik sayısı özelliğine ilişkin genotip x doz interaksyonu ve önemlilikleri..... | 52 |
| Çizelge 4.1.3.1: Yeşil bitkicik sayısı için varyans analiz sonuçları..... | 55 |
| Çizelge 4.1.3.2: Yeşil bitkicik sayısı özelliğine ilişkin mutasyon doz ortalamaları ve önemlilikleri..... | 56 |
| Çizelge 4.1.3.3: Yeşil bitkicik sayısı özelliğine ilişkin genotip x mutasyon doz ortalamaları ve önemlilikleri..... | 58 |
| Çizelge 4.1.4.1: Seraya aktarılan bitki sayısı için varyans analiz sonuçları..... | 60 |
| Çizelge 4.1.4.2: Seraya aktarılan bitkicik sayısı özelliğine ilişkin mutasyon dozu ortalamaları ve önemlilikleri..... | 62 |
| Çizelge 4.1.4.3: Seraya aktarılan bitkicik sayısı özelliğine ilişkin genotip x mutasyon dozu ortalamaları ve önemlilikleri..... | 64 |
| Çizelge 4.1.5.1: Haploid bitki sayısı özelliği için varyans analiz sonuçları..... | 66 |
| Çizelge 4.1.5.2: Haploid bitki sayısı özelliğine ilişkin mutasyon doz ortalamaları ve önemlilikleri..... | 68 |
| Çizelge 4.1.5.3: Haploid bitki sayısı özelliğine ilişkin genotip x mutasyon dozu ortalamaları önemlilikleri..... | 70 |
| Çizelge 4.1.6.1: Spontan doubled-haploid bitki sayısı özelliği için varyans analiz sonuçları..... | 73 |

| | |
|---|----|
| Çizelge 4.1.6.2: Spontan doubled-haploid bitki sayısı özelliğine ilişkin genotip ortalamaları ve önemlilikleri..... | 73 |
| Çizelge 4.1.6.3: Spontan doubled-haploid bitki sayısı özelliğine ilişkin mutasyon doz ortalamaları ve önemlilikleri..... | 74 |
| Çizelge 4.1.6.4: Spontan doubled-haploid bitki sayısı özelliğine ilişkin genotip x mutasyon dozu ortalamaları ve önemlilikleri..... | 76 |
| Çizelge 4.1.7.1: Kallus sayısına göre albino bitkicik sayısı ve yeşil bitkicik sayısı özelliklerine ilişkin genotiplere göre ortalama, yüzde başarı ve değişimleri... | 79 |
| Çizelge 4.1.7.2: Yeşil bitkicik sayısına göre seraya aktarılan bitki sayısı, haploid bitki sayısı ve spontan doubled-haploid bitki sayısı özelliklerine ilişkin genotiplere göre ortalama, yüzde başarı ve değişimleri..... | 80 |
| Çizelge 4.1.7.3: Kallus sayısına göre albino bitkicik sayısı, yeşil bitkicik sayısı ve yeşil bitkicik sayısına göre seraya aktarılan bitkicik sayısı, haploid bitki sayısı ve spontan doubled-haploid bitki sayısı özelliklerine ilişkin mutasyon dozlarına göre ortalama, yüzde başarı ve değişimleri..... | 86 |

ŞEKİL DİZİNİ

Sayfa

| | |
|---|----|
| Şekil 4.1.1: Kallus sayısı özelliği için genotip ortalamaları..... | 44 |
| Şekil 4.1.2: Kallus sayısı özelliği için mutasyon doz ortalamaları..... | 46 |
| Şekil 4.1.3: Kallus sayısı özelliği için genotip x doz interaksyonu ortalamaları..... | 48 |
| Şekil 4.1.4: Albino bitkicik sayısı özelliği için genotip ortalamaları..... | 50 |
| Şekil 4.1.5: Albino bitkicik sayısı özelliği için mutasyon dozu ortalamaları..... | 50 |
| Şekil 4.1.6: Albino bitkicik sayısı özelliği için genotip x doz interaksyonu ortalamalar..... | 52 |
| Şekil 4.1.7: Yeşil bitkicik sayısı özelliği için genotip ortalamaları..... | 54 |
| Şekil 4.1.8: Yeşil bitkicik özelliği için mutasyon doz ortalamaları..... | 56 |
| Şekil 4.1.9: Yeşil bitkicik özelliği için genotipxdoz interaksyonu ortalamaları..... | 58 |
| Şekil 4.1.10: Seraya aktarılan bitki sayısı özelliği için genotip ortalamaları..... | 60 |
| Şekil 4.1.11: Seraya aktarılan bitki özelliği için genotipxdoz interaksyonu ortalamaları..... | 62 |
| Şekil 4.1.12: Seraya aktarılan bitki sayısı özelliği için mutasyon dozu ortalamaları..... | 64 |
| Şekil 4.1.13: Haploid bitki sayısı özelliği için genotip ortalamaları..... | 66 |
| Şekil 4.1.14: Haploid bitki sayısı özelliği için mutasyon dozu ortalamaları..... | 68 |
| Şekil 4.1.15: Haploid bitki sayısı özelliği için genotipxdoz interaksyonu ortalamaları..... | 70 |
| Şekil 4.1.16: Spontan doubled-haploid bitki sayısı özelliği için genotip ortalamaları..... | 73 |
| Şekil 4.1.17: Spontan doubled-haploid bitki sayısı özelliği için mutasyon dozu ortalamaları..... | 74 |
| Şekil 4.1.18: Spontan doubled-haploid bitki sayısı özelliği için genotipxdoz interaksyonu ortalamaları..... | 76 |

RESİMLER DİZİNİ

Sayfa

| | |
|--|----|
| Resim 3.1: Uygun dönemdeki başakların araziden alınması (orijinal)..... | 18 |
| Resim 3.2: Mikrospor gelişim dönemleri..... | 19 |
| Resim 3.3: Soğutuculara konulan materyal (orijinal)..... | 20 |
| Resim 3.4: Soğutucudan çıkarılan materyal (orijinal)..... | 21 |
| Resim 3.5: Besi ortamının hazırlanması (orijinal)..... | 22 |
| Resim 3.6: Besi ortamının steril pipetler ile aktarılması (orijinal)..... | 23 |
| Resim 3.7: Yaprak kınından ayrılan başaklar (orijinal)..... | 23 |
| Resim 3.8: Başakların steril su ile yıkanması (orijinal)..... | 24 |
| Resim 3.9: Anterlerden başakların çıkarılması (orijinal)..... | 24 |
| Resim 3.10: Anterlerin aktarılması (orijinal)..... | 25 |
| Resim 3.11: İnkübatörlere konulan petri kapları (32 ° C ye ayarlanmış) (orijinal)..... | 26 |
| Resim 3.12: Anterlerden gelişen kalluslar (orijinal)..... | 27 |
| Resim 3.13: Anterlerden gelişen kalluslar (orijinal)..... | 27 |
| Resim 3.14: Anterlerden gelişen kallusların aktarılması (orijinal)..... | 28 |
| Resim 3.15: Anterlerden gelişen aktarımı tamamlanmış kalluslar (orijinal)..... | 28 |
| Resim 3.16: Anterlerden gelişen aktarımı tamamlanmış kalluslar (orijinal)..... | 28 |
| Resim 3.17: Kalluslardan gelişen yeşil bitkiciklerin sayısı ve test tüplerine aktarılması (orijinal)..... | 29 |
| Resim 3.18: Test tüpünde gelişen albino bitkicik (orijinal)..... | 29 |
| Resim 3.19: Petri kaplarında bitkicikler (orijinal)..... | 30 |
| Resim 3.20: Kalluslardan rejenerasyon ortamında gelişen yeşil bitkicikler (orijinal)..... | 30 |
| Resim 3.21: 190-2 Cu içeren test tüpleri (orijinal)..... | 31 |
| Resim 3.22: Gelişen yeşil bitkiciklerin test tüplerine aktarılması (orijinal)..... | 31 |
| Resim 3.23: Gelişen yeşil bitkiciklerin test tüplerine aktarılması (orijinal)..... | 32 |
| Resim 3.24: Test tüplerine aktarılan yeşil bitkiler (orijinal)..... | 32 |
| Resim 3.25: Test tüplerine aktarılan yeşil bitkilerin iklim odasına taşınması (orijinal)..... | 32 |
| Resim 3.26: Polietilen torbalar ile kapatılan doubled-haploid bitkiler (orijinal)..... | 33 |
| Resim 3.27: Fenotipik olarak haploid ve doubled-haploid bitkiler (orijinal)..... | 34 |
| Resim 3.28: Stoma hücrelerine bakarak ploidi düzeyinin belirlenmesi..... | 35 |
| Resim 3.29: Seraya aktarılan doubled-haploid bitkiler (orijinal)..... | 35 |
| Resim 3.30: Hasat zamanında doubled ve haploid bitkilere ait başaklar..... | 36 |
| Resim 3.31: Seraya aktarılan doubled-haploid bitkiler (orijinal)..... | 36 |
| Resim 3.32: Seraya aktarılan spontan doubled-haploid bitkilerin hasadı orijinal)..... | 37 |
| Resim 3.33: Bitkilerin hasat edilmesi (orijinal)..... | 37 |
| Resim 3.34: Elde edilen doubled-haploid başakların harmanlanması (orijinal)..... | 38 |
| Resim 3.35: Elde edilen doubled-haploid tohumların ertesi yıl ekim için hazırlanması (orijinal)..... | 38 |

KISALTMALAR

| | |
|--------|---|
| 2,4-D | :2,4 Diklor fenoksi asetik asit |
| ABA | :Absisik asit |
| BAP | :Benzil amino pürin |
| DH | :Doubled-Haploid |
| EKÖF | :En küçük önemli fark |
| IAA | :Indol asedik asit |
| IBA | :Indol bütirik asit |
| BA | :Bütirik asit |
| CIMMYT | :Uluslararası Mısır ve Buğday Araştırma Merkezi |
| KO | :Kareler ortalaması |
| KT | :Kareler toplamı |
| ELS | :Embriyo benzeri yapı (Embryo like structures) |
| MS | :Murashige and Skoog besi ortamı |
| NAA | :Naftalin asetik asit |
| PAA | :Fenil asetik asit |
| SD | :Serbestlik derecesi |
| N 6 | :Nistch (besi ortamı) |
| AC | :Anter kültürü |
| MC | :Mikrospor kültürü |
| DK | :Değişim katsayısı |
| mg | :Miligram |
| L | :Litre |
| cm | :Santimetre |
| g | :Gram |

ÖNSÖZ

Bu tez NKÜBAP tarafından NKUBAP.00.24.DR.13.01 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Öncelikle danışmanım sayın Doç. Dr. Oğuz BİLGİN'e doktora tezimde her türlü fedakarlığı gösterip bana yardım ve desteği için teşekkürü bir borç biliyorum. Yüksek Lisans hocam ve tez izleme komitemde yer alan sayın Prof. Dr. Kayıhan KORKUT, sayın Prof. Dr. İsmet BAŞER, sayın Prof. Dr. Bayram SADE ve Sayın Prof. Dr. Aydın ÜNAY hocalarıma ayrı ayrı teşekkürlerimi sunuyorum.

Ayrıca, doktora çalışmamın laboratuvar kısmında benden yardımlarını esirgemeyen Macaristan'ın Szeged kentinde bulunan Gabano Kutato Araştırma Enstitüsü Bilim Direktörü sayın Prof. Dr. Janose PAUK ve Dr. Csaba LANTOS'a da yardımlarından dolayı teşekkür ediyorum.

Ekim, 2016

Soner Yiğit SARIER

Ziraat Yüksek Mühendisi

1.GİRİŞ

Dünya tahıl ekiliş ve üretiminde önemli bir paya sahip olan buğday bitkisi; ekim alanı yönünden ilk sırada üretim yönünden ikinci sırada yer almaktadır (USDA, 2014). Günümüzde insanların beslenmesi açısından yaşamsal öneme sahip olan tahıllarda, üretim ve kalite sorunlarının çözülmesi için kullanılacak genetik varyabilitenin son sınırlarına yaklaşılmıştır. Ayrıca dünya nüfusu hızla artmakta olup 2050 yılında nüfusun günümüzdekinden yaklaşık %50 oranında daha fazla olacağı ve gün geçtikçe besin açığının artacağı ileri sürülmektedir (Nellemann ve ark., 2009). Bu artışın üstesinden gelebilmek için alınması gereken önlemler arasında en gerçekçi olanı birim alan veriminin artırılmasıdır.

Birim alan veriminin artırılmasında da kültürel uygulamalardaki iyileştirmelerle birlikte, hastalık ve zararlılara dayanıklı, kaliteli ve yüksek verim potansiyeline sahip yeni çeşitlerin geliştirilerek üretime sokulması en önemli aşamayı oluşturmaktadır. Bu da ancak yoğun, etkin ıslah programları sayesinde başarılabilir.

Bir ıslah programının başarısını doğrudan etkileyen en önemli faktör üzerinde çalışılacak materyaldeki genetik varyabilitenin büyüklüğüdür. Genetik varyabilite ne kadar geniş olursa seleksiyonda başarı o denli fazladır. Günümüzde buğday gibi birçok kültür bitkisinde olduğu üzere genetik varyabilite oldukça daralmış durumdadır. Bu varyabilitenin genişletilmesinde yakın ve uzak akrabalar ve cinsler arası melezlemeler ve fiziksel ve kimyasal mutasyonlar gibi klasik ıslah metodları yoğun olarak kullanılmaktadır. Böyle bir genetik varyabiliteyi elde etmek, geleneksel bitki ıslah yöntemlerinin etkinliğini arttırmak ve ıslah süresini kısaltmak için yeni ve yenilikçi teknolojilere gereksinim vardır. Bu teknolojiler içinde en yaygın yararlanılan biyoteknolojik yöntemlerdir. Bu yöntemler arasında en çok ilgi gören doubled-haploid teknolojisidir.

Çeşit geliştirmek amacıyla yürütülen ıslah programlarında verim, hastalıklara, zararlılara, kurağa, soğuğa dayanıklılık vb. özellikler de dikkate alındığından uzun ve kapsamlı bir çalışma gerekmektedir. Son yıllarda, yürütülen ıslah programları farklı biyoteknolojik uygulamalar ile desteklenerek ıslah süresini kısaltmaya ve etkinliği artırılmaya çalışılmaktadır. Bu uygulamaların en önemlilerden biri de haploid tekniği ve buna bağlı olarak doubled-haploidi tekniğinin tahıl ıslahında, özellikle de buğday ıslahında kullanılmasıdır. Doubled-haploid bitki üretiminin avantajları bitki ıslahçıları tarafından çok

uzun süreden beri kabul edilmekte olup, bu yolla farklı bitki türlerinde 280 den fazla çeşit geliştirilmiştir (Szarejko ve Forster, 2007).

Anter kültürü, uygun gelişme dönemindeki henüz olgunlaşmamış mikrosporları içeren anterlerin uygun bir besi ortamına aktarılarak buradan haploid bitkicik elde edilmesinde kullanılan ve bitki ıslahı programının süresini kısaltan biyoteknolojik bir yöntemdir. Anter kültüründe amaç genomun yarı kromozom takımını içeren bitkicikler elde etmek, elde edilen materyalin kromozomlarının katlanmasıyla %100 homozigot materyal elde etmektir. Haploid bitki elde etmek amacıyla kullanılan ve bitki ıslahı için büyük önem taşıyan anter kültürü; bir bitkiden izole edilen anterin uygun bir besi ortamına yerleştirilerek henüz olgunlaşmamış polen tanelerinden bitkilerin geliştirilmesi tekniğidir (Sunderland, 1974). Haploid bitkiler, stoma hücrelerinde tıpkı gamet hücrelerinde olduğu gibi haploid sayıda (n) kromozom içerirler. 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).

Buğdayda doubled-haploid üretiminin mikrospor ya da anter kültürü (androgenesis), ovül kültürü (jinogenesis), yabancı tür kromozomlarının eliminasyonu (mısır ve *H. bulbosum* melezleri) ve yabancı türün sitoplazmasının etkisi ile gerçekleştirilmektedir. Mikrospor ve anter kültürü metodları kültüre alınan anter başına binden fazla haploid bitki üretme potansiyeline sahiptir.

Buğdayda anter kültürüne yanıt yeteneği, çok gen tarafından kontrol edilen kantitatif bir karakterdir, bu nedenle anter kültürüne yanıt yüksek oranda genotipe bağlıdır (Moieni ve ark., 1997; Yeh ve ark., 1999). Bitki ıslahı uygulamalarında karşılaşılan en önemli sorun yüksek oranda albino bitki görülmesi ve yeşil bitkicik rejenerasyonun çok düşük ya da hiç yanıt alınmasıdır (Jauhar ve ark., 2009; Weyen, 2009). Bu sorun, melez kombinasyonlarında köprü melezlerinde kullanılabilecek yüksek anter kültürü yanıtına sahip olan anaç buğday genotiplerinin seçimi ya da ön soğuk uygulaması, hormon uygulamaları farklı kimyasal ya da fiziksel mutagen uygulamaları ile çözülebilir. Böylece, anter kültürünün buğday ıslah programındaki etkinliği ve kullanılabilirliği artırılabilir (Zamani ve ark., 2000; Wang ve ark., 2007).

Buğday ıslahında, üstün genotiplerin geliştirilmesinde doubled-haploidi tekniğine ıslahçıların ilgisi günden güne artmaktadır. Doubled-haploid bitkilerin elde edilmesinde kullanılan biyoteknolojik yöntemlerden anter kültürü tekniği, hem yüksek yanıt alınması ve hem de uygulamasının diğerlerine göre daha kolay olması nedeniyle en çok tercih edilen teknik olmaktadır. Anter kültürü yoluyla doubled-haploid tekniği ile kültür ortamına farklı dozlarda alüminyum uygulaması yapılmış sonuç olarak ekmeklik buğdayda alüminyuma toleransın arttığı gözlemlenmiştir (Bakos ve ark., 2008), donmaya toleransının geliştirilmiş (Humphreys ve ark., 2007), tane veriminin artırılmış (Sadasivaiah ve ark., 2004), DH-mutantlarda erkencilik, hastalıklara dayanıklılık ve su stresine toleransın artırılmıştır (Khan ve ark., 2001). Anter kültürü yöntemi ile ticari doubled-haploid buğday çeşitleri farklı ülkelerde geliştirilmiştir (Barnabas ve ark., 2000; Pauk ve ark., 2003).

Klasik ıslah metodlarında yapılan melezleme ya da mutasyon uygulamalarından elde edilen F_1 - M_1 bitkileri yetiştirilmekte ve izleyen generasyonlarda segregasyona bağlı ıslah amaçları doğrultusunda seleksiyonlar yapılmaktadır. Segregasyon 4-6 yıl devam etmekte ancak bu süre sonunda bile %100 homozigot genotiplere ulaşılamamaktadır. Bu nedenle hem ıslah süresini kısaltmak hem de %100 homozigot materyal elde etmek için anter kültürü kullanılmaktadır.

Bitki ıslahçısı seleksiyonunu ya doğal olarak mevcut varyasyona sahip ya da yapay olarak melezleme ya da mutasyon yoluyla yaratılmış olan varyasyona sahip ıslah materyalinde gerçekleştirir. Bitki ıslahında kullanılan varyasyonun yaratılmasında en kolay yolu mutasyon uygulanmasıdır.

Mutasyon, bir organizmanın genetik yapısında meydana gelen, döllere aktarılan ani ve kalıcı değişimlerdir. Mutagen ise mutasyona neden olan fiziksel ya da kimyasal ajanlara verilen isimdir. Bitki ıslahında ve özellikle de buğday ıslahında mutasyon uygulaması ile a) daralan genetik varyabilitenin genişletilmesi, b) biyotik, abiyotik streslere tolerans ve dayanıklılığının artırılması ve c) morfolojik özelliklerin iyileştirilmesi amaçlanmaktadır. Mutasyon ıslahı kombinasyon ıslahına göre daha az iş gücü ve zamana ihtiyaç duymaktadır.

Mutasyonlar ya spontan olarak ya da çeşitli mutagenlerin kullanılmasıyla yapay yolla meydana getirilirler. Yapay mutagenler genellikle fiziksel ve kimyasal olmak üzere iki

türdür. Kimyasal maddelerin içindedeki etil metansulfonat, etilimin ve nitroetilüretan önemli yer tutmaktadır. Röntgen cihazı, çekirdek reaktörü, kobalt 60, caesium 137 ve fosfor 62 yaygın olarak fiziksel mutasyon kaynağı olarak kullanılmaktadır.

Özellikle mutasyon uygulamaları ile daralan genetik varyabilitenin genişletilmesi ve gen kaynağı koleksiyonlarında bulunması zor olan arzu edilen özellikleri idare eden genlerin yeni allellerinin oluşturulması yanı sıra, biyotik ve abiyotik strese dayanıklı, tane verimi ve bin tane ağırlığı yüksek, kısa boylu ancak uzun başak yapısına sahip genotiplerin geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Genellikle mutasyon ıslahında başarılı olan özellikler; erkencilik, yatmaya dayanıklılık, hastalıklara dayanıklılık, yüksek verim ve daha iyi tane kalitesidir ve bu özellikler sayesinde yeni çeşitler geliştirilmiştir (Maluszynski ve ark., 1995b).

Mutasyon ıslahı üzerine yoğun araştırma ve geliştirme çalışmaları ekonomik olarak önemli bitkilerde gen kaynaklarında genetik çeşitliliği genişletmek ve çeşit ıslahı amacıyla geçen 50 yıldan beri yürütülmüş ve bu çabalar sonucunda resmi olarak 60 tan fazla ülkede 170 bitki türünde 3000 üzerinde yeni çeşit tescil edilmiştir (Kasha, 2005). Mutant çeşitlerin yaklaşık %70 i herhangi bir ıslah çalışması olmadan doğrudan mutant olarak tescil edilmiş, geri kalan %30 luk kısım mutantların kullanıldığı kombinasyon ıslah programları yoluyla geliştirilmiştir (Maluszynski ve ark., 2000). Radyasyon tekniği, kimyasal mutagenlere oranla mutant çeşitleri geliştirmede daha yoğun (%89) olarak kullanılan metod olmuştur. Radyasyonla elde edilen mutant çeşitlerin %64.5'i gamma ışınları ile %22'si ise X ışınları ile gerçekleştirilmiştir. Bu hızlı artış son yıllarda mutasyonun bitki ıslah programlarında başarılı bir şekilde kullanıldıklarını göstermektedir.

Bu mutant çeşitler özellikle boy uzunluğu gibi spesifik özelliklerin kısa zamanda iyileştirilmesi nedeniyle dünya çapında tarımda büyük etki yaratmıştır (Ahloowalia, 1998). Ancak ülkemizde mutasyon ile geliştirilmiş ticari buğday çeşitleri bulunmamaktadır. Mutasyon uygulamasının bitki ıslahı yöntemi olarak uygulanabilir, sürdürülebilir, esnek, kuralsız, tehlikeli olmayan, çevresel olarak kabul edilebilir, son derece etkin ve düşük maliyetli bir teknoloji olduğu göz önünde alındığında (Kainthura ve Srivastava, 2015) ülkemizde de buğday ıslah programlarında mutasyon tekniğinin daha etkin bir şekilde kullanılması gerekmektedir.

Günümüzde, mutasyon üstün çeşitlerin ıslahı yanında, önemli özellikleri idare eden genleri keşfetmek ve bunların fonksiyonları ve etki şekillerini anlamak amacıyla da geniş oranda kullanılmaktadır (Ranalli, 2012). Özellikle arabidopsis, bezelye, buğday, mısır, arpa, çeltik ve domateste mutasyon uygulamaları; (1) Bitki büyüme ve gelişimini kontrol eden (Rutger, 1992; Meinke ve ark., 1998), (2) metabolik ve biyokimyasal özelliklerle ilgili (Jende-Strid, 1993; Sasaki ve ark., 2002), yada (3) abiyotik ve biyotik streslere bitkinin tepkisinden sorumlu (Worland ve Law, 1991; Foster, 2001) vb. birçok genin tanımlanmasına olanak sağlamıştır.

Ancak mutasyonların kullanılmasında önemli sorunlardan biri ağırlıklı olarak mutasyonların resesif doğasıdır. Bundan dolayı allel heterozigot durumda ise arzu edilen fenotipin ortaya çıkışı maskelenir. Ancak arzu edilen fenotipler mutagen uygulamasından sonraki iki ya da üçüncü generasyonda (M2-M3) normal olarak belirlenip seçilebilmektedirler (Forster ve ark.,1996; Jauhar ve ark., 2009).

Doku kültürü varyasyonu yaratmak amacıyla gerçekleştirilen mutasyon uygulamalarının etkinliğini ve iki yöntemin entegre edilmesi ıslah etkinliğini ve süresini azaltmak için önemli bir olanak sunmaktadır (Maluszynski, 2000).

Kombinasyon yani melezleme ıslahı çalışmalarında homozigot hat eldesinde 5-6 yıl gerekir iken mutasyon ıslahında bu oran 3-4 yıldır. Ancak bu tekniklere anter kültürü entegre edildiğinde süre 1-2 yıla düşmektedir. Bu da ıslah süresinin en az 3-5 yıl kısılması anlamına gelmektedir. Kısaca, M₁ bitkiler verici olarak kullanılır uygun başaklardaki anterler uygun dönemde kültüre alınırsa ilk generasyon DH1 de %100 homozigot mutant hatların tek bitki seçimleri yapılarak başarıya ulaşmak olasıdır.

Mutasyon tekniğinin in vitro kültürü özellikle de anter kültürü tekniği ile kombinasyonu “ideal sistem” olarak kabul edilmektedir. Bunun 3 ana sebebi vardır. Bunlardan ilki, haploid ya da doubled-haploid olsun in vitro kültürü tekniği yoluyla geliştirilen bitkiler resesif yada dominant olarak tüm mutasyonlar homozigot olarak ortaya çıkmakta böylece özellikle de resesif mutasyonların ilk generasyonda belirlenmesi mümkün olmakta ve mutant genotipler hızlıca tespit edilebilmesidir. İkincisi, mutasyon işlemleri için geniş bir populasyon sağlaması bu nedenle arzu edilen mutantların tanımlanma olasılığı artırılmasıdır. Üçüncüsü ise, mutantların üretim aşamasında süresince olası kimerizm

önlenmesidir (Xu ve ark., 2012). Böylece, genetik varyasyonların daha kısa sürede etkin bir şekilde oluşturulması ve daha sonra seleksiyon ve arzu edilen genotipler ve anaçlar hastalıksız ortamda çoğaltılmakta ve bitki ıslahı programının etkinliğini artırılmış olmaktadır (Maluszynski ve ark., 1995a; Maluszynski, 2000; Ahluwalia ve Fray, 2000).

Bu teknikler hem tohumla hem de vegetatif üreyen bitkilerde uygulanmakta ancak özellikle kendine döllen bitkilerde uygulandığında, % 0-1 arasındaki dar genetik varyabiliteleri nedeniyle daha etkin sonuçların elde edilebilmesi olasıdır (Peterson ve ark., 1992).

Mutagenesis ve doku kültürleri uygun bir şekilde domateste (Gavazzi ve ark.,1987), mısır ve muz (Novak, 1990), patateste (Ahluwalia ve Frc., 1986), buğdayda (Cheng ve ark., 1990), yağ bitkilerinde (Ashri, 1993), çeltikte (Maluszynski ve ark., 2000) ve diğer bitkilerde (Micke ve ark., 1990) kombine edildiğinde olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Çin ve Fransa'da bu tekniklerin kombine uygulamaları sonucu yüksek verimli, erkenci, tuzluluğa dayanıklı ve kuraklığa toleranslı çok sayıda buğday çeşidi geliştirilmiş ve bunlardan birçoğu buğday üretim alanlarında çiftçiler tarafından kabul görmüştür (Liu ve ark., 2009; Khan ve ark., 2001).

Bu çalışmada amaç ekmeklik buğday ıslahında mutasyon ıslahı ile anter kültürü tekniğinin kombine edilerek normal koşullarda ilk generasyonda ortaya çıkmayan resesif karakterlerin homozigot halde ortaya çıkmasını sağlamaktır.Farklı mutagen dozlar ile anter kültürüne yanıtı düşük olan ekmeklik buğday hatlarının yanıtı arttırılarak üstün genotiplerin kısa sürede elde edilmesini sağlamak oldukça önemlidir. Bu çalışmada uygulanacak farklı mutagen uygulamaları ile daha önce kombinasyon ıslahı ile geliştirilen kalite ve verim yönünden üstün olan hatların kısa sürede elde edilmesi amaçlanmaktadır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Yapılan tez çalışması konusu ekmeklik buğday genotiplerinde değişik mutagen dozlarının uygulanması ile anter kültürün yanıtın yükseltilmesi ve oluşturulan bu varyasyondan kalite özellikleri ve verim yönünden üstün bitkilerin doubled-haploid tekniği ile kısa sürede elde edilmesidir. Mutasyon ıslahı ile buğday genotiplerinde oluşturulacak yeni varyasyona sahip bitkilerin geliştirilmesi uzun süre alabilmektedir. Bu amaçla mutasyon ıslahının kısa sürede tamamlanması ve mutant hatların kısa sürede homozigot olarak elde edilmesi tez çalışmasının başlıca amacıdır. Anter kültürü tekniğini ile ilk generasyonda ortaya çıkmayan resesif ve dominant mutasyonların homozigot halde ortaya çıkmasını sağlamak ve mutasyon dozları ile hatların ve özellikle anter kültürüne yanıtı düşük olan ekmeklik buğdaylarda yüksek yanıt elde edilmesi önem arz etmektedir.

Bourgin ve Nitsch (1967), tütün bitkisinde anter kültürü yoluyla haploid bitkiler elde etmelerinden sonra, özellikle ekonomik önemi fazla olan tahıllar, sebzeler ve şeker pancarı başta olmak üzere günümüze kadar pek çok bitki türünde anter kültürü yoluyla haploid elde edilmesi üzerinde çalışmalar yapılmış ve 25 familyaya ait 200 bitki türünde *in vitro* androgenesis tekniği ile başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Çalışmaların sonucunda 1973'de anter kültürü ile buğdayda katlanmış haploid bitki üretimi başladıktan sonra haploid bitki üretimi konusunda birçok ülkede başarılı sonuçlar alınmıştır. Bu teknik ile Fransa'da Florin (De Buyser ve ark., 1987), Çin'de Jinghua No 1 (Hu ve ark., 1983) ve 764 (Hu ve ark., 1988), Macaristan'da GK Delibab (Pauk ve ark., 1995) buğday çeşitleri geliştirilerek üreticilerin hizmetine sunulmuştur.

Buğdayda doubled-haploid yöntemi 25-30 yıldır kullanılmaktadır. *In vitro* haploid buğday üretimine ait ilk çalışma Çin de 30 yıl önce yapılmıştır (Ouyang ve ark., 1973). Elde edilen haploidlerden doubled-haploid elde etmek için en etkili ve en kolay yöntem kolkhisin uygulaması olduğu belirlenmiştir (Jensen, 1974).

Clapham (1973), tahıllarda haploid bitki elde etme yöntemlerinin içinde anter kültürüne geniş yer vermiş, arpada anter kültürü için en uygun besi ortamı ve anter kültürü dönemini açıklamasıyla araştırmacı haploid bitki üretimi üzerine oldukça yoğun çalışmalar yürütmüştür. Haploid üretimi için ilk metod Kahsa ve Kao tarafından 1970 yılında

yayınlanmıştır. Bu metod, daha sonra çeşitli araştırmacılar tarafından da geliştirilen melezleme ile genetik uyumsuzluğu temel alan Bulbosum Yöntemidir (Kahsa ve Reinbergs, 1975). Ürün verimliliğinin geliştirilmesinde klasik ıslah yöntemleri ile birlikte önemli bir araç olarak kullanılmaktadır.

Bu amaçla bitki türüne bağlı olarak bitkinin farklı kısımları kullanılabilir (Bajaj, 1983). Doubled-haploid ıslahının pratik uygulamaları üstün ıslah hatları ve çeşitlerinin geliştirilmesi ile ortaya konmuştur. Anter kültürü ile ilk geliştirilen buğday çeşidi Jinghua No. 1. çeşididir (Hu ve ark., 1986). Avrupa da ilk adrojenetik olarak geliştirilen çeşit Florin (De Buyser ve ark., 1987) Fransa da geliştirilmiştir.

Genetik olarak doubled-haploid hatlar ıslah programını hızlandıracak ve seleksiyon etkinliğini arttırarak bitki ıslahının gelişimine katkıda bulunacaktır. Bu anlamda haploid ve doubled-haploid hat üretimi ıslahçılar için bir ışık olmaktadır. Doubled-haploid sistemle çalışan kültür bitkilerinden en önemlileri çeltik, buğday, arpa, mısır, kolza ve patatestir. Doubled-haploid bitkiler tür içi veya tür dışı genetik uyumsuzluk gösteren melezlemeler ile elde edilebildiği gibi dişi ve erkek gametofitik hücrelerden yani anterlerden, izole edilmiş mikrospordan, ovaryumdan doku kültür tekniği ile de elde edilebilmektedir (Kasha, 1989).

Machii ve ark. (1998), 107 japon buğday genotipi ile yaptıkları çalışmada; anter ve olgunlaşmamış embriyo kullanarak, kallus ve rejenerasyon oluşumunu belirlemek için yaptıkları araştırmalarında, anter kültüründe 107 genotipten 83'ünde kallus oluşumu ve bunlardan da 45'inde bitki rejenerasyonu elde edildiğini ve olgunlaşmamış embriyo kültüründe ise genotiplerin kallus oluşumunda artışa karşılık anter kültürüne göre daha çok miktarda albino bitki oluştuğunu saptanmışlardır. Araştırmacılar doku kültüründe bitki rejenerasyonun genotipe göre değiştiğini belirtmişlerdir.

Worobey ve Holmes (1999), belli coğrafik bölgelerdeki buğday genotipleri ile anter kültürüne yanıt açısından daha güçlü bir bağlılığının bulunduğunu ve özellikle Avrupa'nın doğusundaki buğday hatlarında 100 anter başına 3,6 bitki oluştururken; kuzey-batı Avrupa hatlarında 100 anter başına 0,4 bitki oluşturduğunu, dolayısıyla anter kültüründe Doğu Avrupa'daki çeşitlerin kuzey ve Batı Avrupa'ya göre daha etkin biçimde kullanılabileceğini açıklamışlardır.

Günümüzde doubled-haploid hat üretimi; anter kültürü, mısır ve buğday melezi ile *H. bulbosum* buğday melezlemesi yoluyla gerçekleştirilmektedir (Szakacs ve ark.,1988). Bu yöntemlerin başarısını sınırlayan bazı faktörler vardır. Bunlardan bazıları; iş gücü, düşük etkinlik ve genotipe yüksek oranda bağımlılıktır. Özellikle de anter kültüründe haploid elde edilmesindeki yüksek oranda kullanılan genotipin doku kültürüne yanıtına bağlıdır ve başarıyı verici bitkinin olgunluk dönemi de etkilemektedir (Kristiansen ve Andersen, 1993). Ancak, anter kültürü çalışmasının diğer in vitro haploid bitki elde etme tekniklerine göre avantajı, bir anter içerisinde çok sayıda çiçek tozunun bulunması ve uygun bir in vitro kültür sistemi ortaya konulabildiğinde bir anterden çok daha fazla sayıda haploid bitki elde edilebilmesidir.

Khan ve Malik (1999), Pakistan'da (0-150-250-350 ve 400 Gy) gama ışını Pak-81, LU-26 ve SS-5 ekmeklik buğday çeşitlerinde uygulamışlar doz miktarı arttıkça çimlenme oranı ve bitki boyunun azalması ile birlikte, 450 Gy dozda kontrole göre çimlenme oranının % 79, bitki boyunun ise % 19,9 azaldığını açıklamışlardır.

Irfac ve Nawab (2003), 3 farklı ekmeklik buğday saf hattında (Prsobek-91, Khyber- 87 ve Tarneb-78) ⁶⁰Co kaynağından dört farklı gama dozu (100-200-300 ve 400 Gy) uygulamışlar ve gamma dozlarının çimlenme yüzdesi, hayatta kalma oranı, kardeş sayısı, başaklanma oranı, başak uzunluğu, başakta tane sayısı ve tane verimi üzerine etkilerini ele aldıkları çalışmada, genel olarak en fazla azalmayı bitkide kardeş sayısında belirlemişlerdir. Kardeş sayısında asıl kayda değer etkinin 300-400 Gy dozda olduğu, 100 Gy dozda en yüksek ve 400 Gy dozda en düşük tane verimi elde edildiğini, başaklanma süresine bakıldığında en erken başaklanmanın 400 Gy dozda olduğu açıklamışlardır.

Kuşaksız ve Dere (2010), 3 farklı makarnalık buğday çeşidinin (Salihli-92, Ege-88, Gediz-754) tohumlarına uygulanan 3 farklı (0-100-300 Gy) dozun etkilerini araştırdıkları çalışmaları sonucunda % 25 seleksiyon yoğunluğunda yaptıkları tek başak seleksiyonu sonucu elde edilen mutant hatları ile 2 farklı lokasyonda (Bornova ve Alaşehir) 2003-2004 ve 2004-2005 yıllarında yürüttükleri verim denemeleri sonucunda, mutant hatlarında kontrole oranla genetik ilerlemenin tane veriminde önemli derecede fazla olduğunu belirtmişlerdir.

Bir anter kültürü tekniğinde düşük dozda gamma ışınlanması, besi ortamında açlık yaratılması, osmotik ve soğuk stres uygulanması anter kültürüne yanıtın artırılmasına katkı

sağlamak ve dolayısıyla başarıyı ulaşabilmek için gerekli parametrelerdir. Ding ve ark. (1991) ve Belchev ve Kostov (2003) düşük dozdaki gama ışınlarının (maksimum 7 Gy) buğdayda anter kültürüne yanıtı arttırabileceğini belirtmişlerdir. Bu pozitif etkinin patatesten (Al-Safadi ve ark., 2000) ve arpada (Arabi ve ark., 2005) da olabileceği açıklanmıştır.

Shariatpanahi ve ark. (2006), ekmeklik buğday genotiplerinde yapılan stres uygulamaları ile mikrospor embriyogenesisinin etkilenebileceğini vurgulamışlardır.

Din ve ark. (2004), yaptıkları çalışmalarında ekmeklik buğday danelerine uygulanan gama ışını dozu arttıkça çimlenme oranının azaldığını en düşük çimlenme oranının 14,60 ile 450 Gy dozda en yüksek çimlenme oranı % 74,26 ile kontrolde elde edildiğini, 150 Gy doz ile kontrol arasında önemli farklılık gözlenmemek ile birlikte, 250, 350 ve 450 Gy de önemli farklılıklar bulunduğunu belirlemişlerdir. Bitki boyu incelendiğinde beş buğday genotipinde artan dozlarda bitki boyunun azaldığını bitki boyunda maksimum azalmanın 450 Gy dozun ve kontrole göre %23,63 oranında olduğunu, bitki başına kardeş sayısında azalmanın 450 Gy de kontrole göre %52,63 oranında gerçekleştiğini açıklamışlardır.

Sarier (2010), anter kültürü üzerine yaptığı çalışmada 5 farklı besi ortamı (MS-2) (IBA+Kinetin), YPI (2,4-D+IBA), MS-1 (2,4-D+NAA), N-6 (2,4-D+NAA) ve P II (IBA+Kinetin) kullanmış ve anter kültüründe yanıtın besi ortamı ve kullanılan genotipe göre değiştiğini belirtmiştir.

Rahimi ve Bahrani (2011), 2009-2010 yılında; iki farklı buğday çeşidi olan Alamut ve Zagros tanelerine birisi kontrol olmak üzere 6 farklı gama ışını (0, 25, 50, 75, 100 ve 125 Gy) uyguladıkları çalışmaları sonucunda, bin dane ağırlığı, dane protein içeriği ve hasat indeksinin gama ışınlarından önemli oranda etkilendiğini ortaya koymuşlardır. Bin dane ağırlığı bakımından en yüksek değer Zagros çeşidinin 250 Gy dozundan elde edildiğini belirtmişlerdir. İki çeşit karşılaştırıldığında Zagros Alamut tan daha fazla dane verimi vermiş, 25 ve 50 Gy doz en yüksek dane protein içeriğini vermiştir. Doz 50 Gy üzerine çıktığında dane verimi %28-67 aralığında azalmıştır. En yüksek yaprak alan indeksi ve bitki büyüme oranı kombinasyonu Zagros çeşidinden elde edilmiştir.

Morad ve ark. (2011), 4 farklı ekmeklik buğday çeşidinin (Gemmeiza 9, Gemmeiza 7, Sakha 93 ve Giza 168) tohumlarına 50, 100 ve 150 Gy gamma ışını uygulayarak 2009- 2010

ve 2010-2011 yetiştirme sezonlarında M_1 ve M_2 generasyonları ile yürüttükleri çalışmalarında; bitki boyu, bitkide başak sayısı, başak uzunluğu, başakta başakçık sayısı, başakta tane sayısı, 1000 dane ağırlığı ve bitkide dane ağırlığı özelliklerini incelenmişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre; mutasyon dozlarındaki artışla incelenen özelliklerde arzu edilen yönde önemli iyileşmelerin olduğu ve M_2 generasyonunda tahmin edilen dar anlamda kalıtım derecelerinde bir önceki generasyona göre artış meydana geldiği belirtilmiştir.

Human ve ark.(2012), Endonezya' daki Ulusal Nükleer Araştırma Birimi (BATAN) mutasyon uygulaması ile sorgum çeşit geliştirme çalışmalarında Durra çeşidinin tohumlarına 300-500 Gy gamma ışını dozlarını uygulamışlar ve kurağa dayanım gösteren 10 mutant hat elde etmişlerdir. Bu geliştirilen mutant hatlardan B-78, B-72, B-95 ve B-100 hatlarının tane verimleri sırası ile 455, 450, 420 ve 462 kg/da ile anaçlar Durra (350 kg/da) , UPCA (268 kg/da) ve Hagari (375 kg/da) ye göre yüksek verime sahip olduklarını belirtmişlerdir.

Lagheri ve ark.(2012), Pakistan'da tür içi melezleme ile yetiştirilen 12 ekmeklik mutant buğday hattı içlerinde 4 standart yerel çeşit (Sarsabz, Kiran 95, TJ-83 ve Khirman) ile birlikte değerlendirilmişler. Mutant hatlardan MASR-3 ve MASR- 64 ün diğer kontrol çeşitlerinden erkenci olduğu, MASR – 64 ve MASR-6 nın 542 ve 538 kg/da ile en yüksek verim verdiği, ayrıca MASR-3, MASR-9, MASR-14 ve MASR-64 ün sırasıyla 1000 dane ağırlığının 45,2, 47,7, 45.7 ve 45,0 olduğu görülmüştür. En yüksek başakta tane sayısı yüzdesi; MASR-64 (79,9), MASR-6 (71,8), MASR-8 (68,5) olmuştur. Ana başakta tane verimine bakıldığında ise mutant MASR-64 4,15g ile en yüksek verimi vermiştir.

Lantos ve ark. (2013a) yaptıkları çalışmalarında serada ve tarla koşullarında yetiştirilen 2 Macar kışlık ticari tritikale (GK Idus ve GK Szemes) çeşidinin ELS(embriyo benzeri yapı), yeşil bitki ve albino bitki sayılarını incelemişlerdir. Tarla şartlarında yetiştirilen GK Idus çeşidinden alınan anterlerden en fazla yeşil bitki elde edilirken sera şartlarında yetiştirilen ve anter alınan GK Szemes ten daha az yeşil bitki ve daha fazla albino ve ELS elde edilmiştir. Sonuç olarak yapılan varyans analizinde çevre ve çevre genotip interaksyonu önemli bulunurken, yeşil bitki üretiminde genotipin bir etkisinin olmadığı belirtilmiştir.

Buğdayda genotiplerin anter kültürüne yanıtını arttırmak ve buğday ıslahında etkinliği arttırmak amacıyla anter kültürü üzerine farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalar aşağıda özet şeklinde verilmiştir.

Buğdayda anter, çiçek tozu, embriyo ve protoplastların kullanılmasıyla başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Pauk ve ark., 1995).

Saisingtong ve ark. (1996), anter kültüründe en yüksek yanıtı ETH-M 36 isimli buğday genotipinden başlangıç besi ortamına 250 mg/L maltoz ilave ederek yapmış oldukları 7 günlük ön uygulama çalışmaları sonucunda 9,9 dihaploid bitki /100 anter olacak şekilde elde etmişlerdir.

Petolino ve ark. (1997), mısır bitkisinde anter kültürüne yanıtı 4 ticari hattın diallel melezlerini kullanarak in vitro da inceledikleri çalışmaları sonucunda; genotipler arasında önemli farklılıklar gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmada, H-99 x FR-16 ve PA-91 x FR-16 melezlerinin ebeveynlere oranla anter kültürüne daha yüksek yanıt verdiklerini ortaya koymuşlardır.

Zhang ve ark. (2000), anter kültürü ile 50 farklı melez kombinasyondan 200 ün üzerinde saf hat elde etmişlerdir. Çalışmalarında haploid bitki elde edilmesinde kullandıkları besi ortamlarından en fazla yanıtı ortamı bileşiminin; 2 mg/L 2,4-D, % 0.5 lik aktif karbon, 500 mg/L kazein hidrolizat, 0.2 mg/L TIBA ve % 15 sakaroz eklenmiş N-6 besi ortamı olduğunu belirtmişlerdir.

Korkut ve ark. (2001), Tekirdağ'da bazı ekmeklik buğday genotiplerinin anter kültürüne yanıtları üzerine yapmış oldukları çalışmada; kallus, albino ve yeşil bitki yanıtlarını düşük bulmuşlardır. Çalışmada kullanılan 25 genotipten 23 ü kallus geliştirmiş. Bunlardan 3 tanesinde hiç bir organogenesis görülmemiş, 20 tanesinde ise organogenesis görülmüştür. 20 genotipin 15 inden ise yeşil bitki elde etmişlerdir.

Jager ve ark. (2005), düşük yanıtı kışlık 'Berengar' ve yüksek yanıtı 'Svilena' buğday genotiplerini ve bunların 91 F₁ melezinde yaptıkları anter kültürü çalışmalarında ELS, bitkicikler, yeşil bitkiler, albino bitki sayıları üzerine genotip, yıl ve çevre faktörlerinin etkilenmeleri araştırmışlardır. Buna karşın melezleme ıslahından yeşil bitkilerin üretimi

etkilenmemesi ile her yüz anterde 0,04 ile 28,67 ortalamada kalırken, melez ortalamalarında ise 5,3 yeşil bitki elde edilmiştir. Yeşil bitkilerde aklimitizasyon yani iklime alıştırmada bitkilerin yaşama oranı %91,21 dir. Bu çalışma göstermiştir ki anter kültürü tekniği kışlık buğdayda ıslah programında hem daha etkili hem de daha düşük maliyetli alternatif teknolojidir.

Lantos ve ark. (2006), yürüttükleri çalışmalarında buğday çeşitleri; GK Manó, GK Garaboly, GK Hargita, GK Csongrád, GK Délibáb, GK Élet, GK Kata, GK Bán, Mv Palotás'ı materyal olarak kullanmışlar ve her genotipten alınan anterlerden embriyoya benzer yapıların oluştuğu ve bunlardan da albino ve yeşil bitki gelişiminin gözlemlendiğini açıklamışlardır.

Slusarkiewlcz-Jarzina ve Ponitka (2007), yulafta yaptıkları çalışmalarında 8 genotipten embriyoya benzer yapı elde etmişlerdir. En yüksek yanıtın CHD1780/05 ve CHD1989/05 genotiplerinden elde edildiğini, yalnızca 2 genotipten elde edilen bitki rejenerasyonu sonucunda toplam 35 bitki elde edildiğini belirtmişlerdir.

Redha ve Talat (2008), ekmeklik buğdaylarda anter kültüründe yanıt üzerine ficoll, colchsine ve maltozun etkisini araştırdıkları çalışmalarında maltoz uygulamasının sakkarozaya göre bitki rejenerasyonunu artırdığını belirlemişlerdir.

Plamenov ve ark. (2009), iki makarnalık buğday çeşidi Satürn-1 ve Neptün-2, *Triticum durum x Triticum monococcum* melezini kullandıkları çalışmalarında, anter kültürü ile kallus, bitki rejenerasyonu, albino ve yeşil bitki üretimini incelemişler ve yabani buğday anaçlarının sadece albino bitki verdiklerini bildirmişlerdir.

Abdel-Hady ve Ali (2006), Sids-1, Sakha-93, Sahel-1 ve Giza-168 ekmeklik buğday çeşitlerine (150, 250, 350 ve 450 Gy) gamma ışını uygulamasının M₂ generasyonunda bitki olgunlaşmamış embriyo kültürü kallus gelişim oranı, bitki rejenerasyonu, agronomik özellikler üzerine etkilerinin araştırdıkları çalışmalarında, gamma ışını uygulanan 4 çeşidin farklı etkilendiğini ve 150 Gy dozunun incelenen tüm özellikler üzerine uyarıcı bir etkiye sahip olduğunu açıklamışlardır. Diğer taraftan, incelenen tüm özellikler bakımından kontrol ile karşılaştırıldığında yüksek dozların önemli azalmalara neden olduğunu belirtmişlerdir. Sids-1 çeşidinin kontrolle karşılaştırıldığında 150 Gy gamma dozunda kallus oluşumu

yüzdesi, bitki rejenerasyon, tüm gelişme özellikleri, verim ve komponentlerinde artışlar olduğunu ortaya koymuşlardır.

Ghaffari ve ark. (2009) iki yerel buğday populasyonunun agronomik olarak üstün tek bitkilerine (100, 250, 200 ve 250 Gy) gama ışını uygulamışlar ve bunların M₃ generasyonundaki bitkilerini kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonunu incelemişler, genotipler arasında gamma ışınının kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu üzerine önemli etkilere sahip olduğunu belirlemişlerdir. İki yerel populasyonda herhangi bir kallus oluşumu gözlenmediğini, buna karşılık M₃ bitkilerinde en yüksek kallus oluşumunun %68,6 ile L9.200.2'de ve en yüksek bitki rejenerasyonu ise %93,1 ile L 8.150.1'de elde edildiğini, gamma dozları arasında 200 Gy de en yüksek kallus oluşumu (%12,5) ve 150 Gy de en yüksek bitki rejenerasyonu (%67,3) belirlendiğini böylece daha yüksek anter kültürüne yanıtı sahip bitkilerin üretiminde kontrolle karşılaştırıldığında gamma ışının pozitif etkiye sahip olabileceğini açıklamışlardır.

Mihaly ve ark. (2014), mikrospor ve anter kültüründe yanıtı çok düşük inatçı bir bitki olan yulafta (*Avena sativa* L.) çeşitli faktörler kullanarak *in vitro* da yeşil bitki rejenerasyonunu arttırmak amacıyla panikulalara ön soğuk uygulaması yapmak ya da anterleri karbonhidrat solüsyonunda tutmak, besi ortamına çeşitli büyüme düzenleyicilerinin (auxin, sitokinin, ethylen) farklı dozlarını ekleyerek yürüttükleri başarılı çalışmaları sonucunda erken generasyonda homozigot DH yulaf bitkileri elde ederek zaman, maliyet ve iş gücünden tasarruf sağlanabileceğini vurgulamışlardır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmada materyal olarak Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümünde melezlemeler sonunda geliştirilmiş 2 ileri ekmeklik buğday hattı kullanılmıştır çalışmada materyal olarak kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Araştırmada materyal olarak kullanılan genotipler

| Genotipler | Pedigri (Orijin) |
|------------|------------------------|
| FA | Flamura 80/Atilla 12 |
| BSB | Bezostaja 1/Saraybosna |

3.1.1. Genotiplerin özellikleri

FA (Flamura 80/Atilla 12) :Bitki boyu 110-120 cm arasında, sağlam yapılı ve gri yeşil renkli uzun yaprakları tüsüzdür. Başakları ise kılçıklı, beyaz kavuzlu, uzun, sık ve yarı diktir. Taneleri kırmızı yarı sert ve orta iriliktir. Kışlık karakterli bir hat olup, soğuğa dayanıklılığı ve kuraklığa toleransı yüksektir. Orta erkenci olup, yatmaya dayanıklılığı zayıftır. Sarı pasa dayanıklı olup, kara ve kahverengi pasa orta derecede dayanıklıdır. Sürme ve rastık hastalığına orta derecede hassastır. Kök ve kök çürüklüğü hastalıklarından önemli ölçüde etkilenir.

BSB (Bezostaja 1/Saraybosna) : Beyaz başaklı, kılçıksız bir çeşit olup, başakları uzun ve dik bir yapıya sahiptir. Bitki boyu 110-125 cm arasındadır. Tanesi kırmızı renkli, sert ve iri olup, ekmeklik kalitesi iyidir. Kışlık bir çeşit olup, soğuklara dayanıklılığı çok iyidir. Kardeşlenme kapasitesi yüksektir. Yatmaya dayanımı zayıftır. Sarı pasa orta, kahverengi pas ve virüs hastalıklarına hassastır. Kök ve kök boğazı hastalıklarına toleranslıdır.

3.2. Yöntem

Araştırmada materyal olarak kullanılan ekmeçlik buğday genotiplerinin tohumları ışınlama öncesi standart elekten geçirilmiş ve tohumların nem içeriklerinin uygun olup olmadığı (%13-14) portatif tipi nem ölçer ile kontrol edilmiştir. Her gama ışını dozu için en az 2500 adet tohum sayılarak 12 x 8 cm ebatındaki şeffaf plastik torbalara konularak ışınlama yapılmak üzere Türkiye Atom Enerjisi Kurumu, Sarayköy Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi (SANAEM) e gönderilmiştir.

Işınlama işlemi, 2.190 kGy h⁻¹ gücündeki Kobalt 60 (⁶⁰Co) kaynağından elde edilen gamma ışını ile 7 farklı gamma dozu (100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 Gy) ile gerçekleştirilmiştir. Işınlama sonrası uygulama yapılmayan kontrol uygulamaları ile birlikte toplam 16 M₁kombinasyonu tohumlarının yarısı en kısa sürede Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü deneme alanına ekilmiştir. Diğer yarısı ise anter kültürü materyali olarak Macaristan Gabonakutato Kft. Araştırma enstitüsü deneme alanına ekilmiştir.

Verici bitkilere 1:1:1 (20-20-20) 12 gr/m² N-P-K gübrelemesi yapılmıştır. Nisan ortasında 18 gr/m² amonyum nitrat, iki kez thribenuron methyl ve insektisit olarak alpha cypermethryn uygulanmıştır. Thribenuron methyl uygulanana kadar ot mücadelesi mekanik olarak yapılmıştır. Nedeni ise erken dönemde bitkiyi total herbisit olan thrybeniron methyl ile strese sokmamaktır(Pauk ve ark., 2003).

3.2.1 Anter kültürü uygulanması

Anter kültürü çalışmasında kullanılan başlıca safhalar;

- Verici bitkinin seçilmesi,
- Çiçek tozu gelişiminin izlenmesi ve anterlerin alınması,,
- Ön soğuk uygulanması,
- Besi ortamının hazırlanması,
- Sterilizasyon,
- Anterlerin besi ortamına aktarılması,
- Kallusların gelişimi ve rejenerasyon ortamına aktarılması,

- Kalluslardan gelişen albino ve yeşil bitkiciklerin sayılarının belirlenmesi ve yeşil bitkiciklerin test tüplerine aktarılması,
- Test tüplerinde gelişen bitkiciklerin toprak bulunan küçük tüplere aktarımı ve vernalizasyon yapılması,
- Morfolojik olarak belirlenen spontan doubled-haploid bitkilerin iklime alıştıırılması,
- Bitkilerin saksılardan seraya aktarılması,
- Bitkilerin hasadı.

Günümüzde çeşit ıslahında kombinasyon ıslahı ve mutasyon ıslahı yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu iki tekniğin biyoteknolojik yöntemlerle desteklenmesi üzerine ise yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Buğdayda mutasyon ıslahı üzerine farklı çalışmalar yapılmıştır. Yine anter kültürü üzerine de az sayıda olmakla birlikte çalışmalar bulunmaktadır. Çalışmamızda geliştirilen buğday hatlarının anter kültürüne yanıtını arttırmak için farklı mutagen dozlarının etkisi araştırılmıştır. Ülkemizde mutagen dozlarının buğdayda anter kültürüne yanıtı azaltıp, ya da arttıracığı konusunda çalışma bulunmamaktadır.

Anter kültürü ile özellikle gamma ışınlarının kullanıldığı mutasyon ıslahı kombine edildiğinde, mutagen uygulamasıyla oluşan ve normal şartlarda dominant allellerin epistatik etkisi altında kalan resesif alleler haploid devre süresince katlanarak homozigot diploid (doubled-haploid) ve aynı generasyonda fenotipik olarak ortaya çıkacaktır. Yani ilk generasyonda homozigot mutant saf hatlar elde edilebilmektedir. Bunun sonucunda seleksiyon etkinliği artmış olacaktır. Ancak halen buğdayda anter kültüründe istenen yanıt düzeyine ulaşılamamıştır. Ülkemizde mutant buğday genotiplerinde anter kültürü çalışması bulunmamaktadır.

3.2.1.1. Verici (donör) bitkinin seçilmesi

Çalışmamızın ilk basamağını verici bitkilerin seleksiyonu oluşturmaktadır. Verici bitkinin yetiştirme koşulları ne kadar iyi olursa anter kültürüne yanıtları da o denli fazla olacaktır. Ayrıca ana başaklardan alınan örneklerden kardeş başaklara göre daha iyi yanıt elde edilmektedir. Yaptığımız çalışmada deneme alanında yetiştirilen sağlıklı ve güçlü gelişen bitkilerde ana başaklar seçilerek materyal olarak kullanılmıştır.



Resim 3.1. Uygun dönemdeki başakların araziden alınması (orijinal)

3.2.1.2.Çiçek tozu gelişim dönemi

Anterlerdeki mikrosporların gelişim dönemleri incelenmek için başakların orta kısmında bulunan anterler kullanılmıştır. Bu anterler aseto karmin ile boyanmış ve mikroskop altında mikrospor gelişim dönemleri belirlenmiştir. Anterlerde erken-orta tek çekirdekli dönemde olan mikrosporlar soğuk uygulaması süresince gelişerek ve soğuk uygulamasının sonunda orta tek çekirdekli döneme ulaşmıştır. İn vitro da androgenesis için optimum çiçektozu gelişim dönemi orta tek çekirdekli dönemdir (Barnabas ve ark., 2001).

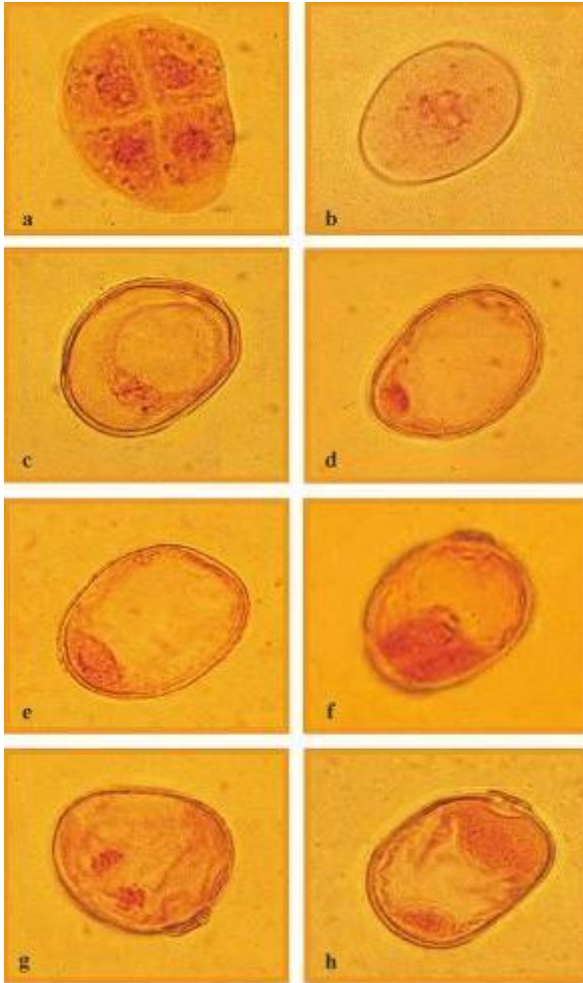
Buğdayda anter kültürü üzerine yürütülen çalışmalar anter kültürüne yanıtta en önemli faktörlerden birisinin anterler içindeki çiçek tozlarının gelişim dönemi olduğunu ortaya koymuştur. Yapılan çalışmalara göre, erken-orta tek çekirdekli mikrosporlar en iyi yanıt vermektedir. Nitsch ve ark. (1982) orta tek çekirdekli dönemin en uygun dönem olduğunu ortaya koymuşlardır. Orta tek çekirdekli dönem çekirdeğin merkezde olduğu ve henüz bir vakuol oluşumunun gözlenmediği dönem olarak belirlenmiştir. Orta tek çekirdekli dönemde genellikle genotipler arasında farklılık görülmekle birlikte en iyi yanıt alınan dönem olarak belirlenmiştir.

Genovesi ve Collins (1982), yaptıkları çalışmalarda orta tek çekirdekli dönemdeki anterleri iki gruba ayırarak incelemişlerdir. On dört günlük soğuk uygulamasından sonra hafif sarı görümlü anterler dokunulduğunda kolayca patlamışlardır. Bu sınıf anterler oldukça düşük anter kültürü yanıtı vermişlerdir. Buna karşın soğuk uygulamasına, sarı-portakal renkli,

ince, uzun anterler en iyi yanıtı vermişlerdir. Çay (2012), buğday melez kombinasyonlarında yaptığı çalışmada en uygun çiçek tozu gelişim döneminin orta tek çekirdekli dönem olduğunu belirlemiştir.

Araziden alınan örnek materyallerdeki başaklar laboratuvar ortamına getirelerek içlerinden anterler çıkarılmak sureti ile çıkarılan anterler ezilerek üzerlerine asetokarmin damlatılarak mikroskop altında mikrosporların gelişme dönemleri incelenmiştir.

Yapılan inceleme sonucunda bayrak yaprak kınından çıkmamış ve 3-4 cm kın içinde kalan başaklardaki anterlerin mikrospor gelişiminin orta-erken univalent safhada olduğu anlaşılmış ve araziden alınan materyallerde morfolojik olarak bu durum dikkate alınarak yapılmıştır.



Resim 3.2. Mikrospor gelişim dönemleri a) tetrad dönemi b) erken tek çekirdekli dönem c) erken-orta tek çekirdekli dönem d) orta tek çekirdekli dönem e) orta-geç tek çekirdekli dönem f) geç tek çekirdekli dönem g) ilk mikrospor bölünmesinin anafaz dönemi h) iki çekirdekli dönem (Szarejko, 2003).

3.2.1.3. Ön soğuk uygulaması

Genel olarak erken ve orta erken univalent safha bayrak yaprak ile başağın sapa bağlandığı boğum arası ortalama 10 cm'dir. Alınan genotipler ön soğuk uygulamasından önce başakları olası fungal enfeksiyonlardan korumak amacı ile bayrak ve diğer yapraklar kesilerek uzaklaştırılmıştır. Başaklar şeffaf bir polietilen torbaya sarılarak, içinde bir miktar su bulunan kavanozların içerisine konularak 4⁰C a ayarlanmış soğutucuların içlerine konulmuştur.



Resim 3.3. Soğutuculara konulan materyaller (orijinal)



Resim 3.4. Soğutucudan (+ 4 °C) çıkarılan materyal (orijinal)

3.2.1.4.Besi ortamının hazırlanması

Anter kültürü çalışmamızda sıvı ortam deiyonize suda besleyicilerin çözülmesiyle hazırlanmıştır. Ancak hücrelerin hasar görmemesi için ortamın ozmotik potansiyelinin iyi ayarlanması (izotonik) gerekir. Bu amaçla çözeltiliye 80 g/lmaltoz ilave edilmiştir. Ayrıca doku kültürü çalışmaları nispeten hassas çalışmalar olduğu ve hücrelerde metabolik faaliyetlerin sağlıklı yürütülebilmesi gerektiği için ortamın pH değeri de önem taşır; ne çok asidik ne de çok bazik olmalıdır. Bu amaçla uygun tamponlarla (% 1 lik HCl veya NaOH gibi) ortam pH'ının 5.5-5.8 arasında olması sağlanmıştır (Pauk ve ark., 2003).

Anter kültüründe başlangıç ortamı olarak W₁₄Fsıvı besli ortamı kullanılmıştır (Çizelge3.2) Besli ortamında gerekli kimyasallar tartıldıktan sonra, sterilizasyon amacı ile besli ortamı 15 dakika 121 °C 105 kPa' da otoklavlanmıştır. Daha sonra besli ortamları kullanılmaya kadar laboratuvarında buzdolabında tutulmuştur. Daha önceden steril hale getirilmiş ve steril kabin altında hazırlanmış olan petri kaplarına (90 mm çapında) anter kültürü inokulasyonu esnasında steril kabin altında, her petri kabında 12 ml olacak şekilde sıvı besli ortamı steril mikropipetler ile aktarılmıştır.



Resim 3.5. Besi ortamının hazırlanması (orijinal)

Çizelge 3.2. Buğday genotiplerinin anterlerinin aktarıldığı başlangıç besiy ortamı (Ouyang ve ark.,1989)

| Besi ortamı | W14F (mg/l) | Besi ortamı | W14F (mg/l) |
|---|-------------|---|-------------|
| KNO ₃ | 2000 | Co Cl ₂ x6 H ₂ O | - |
| KCl | - | Na ₂ Mo O ₄ x 2H ₂ O | - |
| NH ₄ H ₂ PO ₄ | 380 | K ₂ SO ₄ | 700 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | - | Ficoll | 100.000 |
| CaCl ₂ x H ₂ O | - | Thiamine HCl | 2.0 |
| KH ₂ PO ₄ | - | Pyridoxine HCl | 0.5 |
| Ca(NO ₃) ₂ x 4H ₂ O | - | Nicotinic acid | - |
| CoCl ₂ x 6H ₂ O | 0.025 | Nicotinsav | 0.5 |
| MgSO ₄ x 7H ₂ O | 200 | Gliserin | - |
| NA ₂ EDTA x 2H ₂ O | 37.3 | 2,4-D | 2 |
| FeSO ₄ x 7H ₂ O | 27.8 | Glycine | - |
| ZnSO ₄ x 7H ₂ O | 3 | Maltoz | 80.000 |
| H ₃ BO ₃ | 3 | Kinetin | 0.5 |
| KI | 0.5 | Folic acid | |
| CuSO ₄ x 5H ₂ O | 0.025 | | |
| CaCl ₂ x 2H ₂ O | 140 | | |
| pH | 5.8 | | |



Resim 3.6. Besi ortamının steril pipetle petri kaplarına aktarılması (Orijinal)

3.2.1.5. Başakların sterilizasyonu

Ön soğuk uygulamasından sonra başaklar üzerindeki yaprak ve diğer aksamlar atılmıştır. başaklardaki anterler besi ortamına yerleştirilmesinden önce yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Bu amaçla, sterilizasyonda 40g/lt sodyum hipoklorit; %50 deiyonize su ve % 50 hypo olarak hazırlanmıştır. Yarım litre (500 ml)'lik her bir mavi kapaklı şişeye bir genotipten maksimum 10 adet başak konulmuş ve yarıya kadar sterilan sıvı konularak 20 dakika boyunca yatay olarak çalkalanmıştır. Ardından steril kabin içinde yine önceden hazırladığımız steril su ile üç-dört defa yıkanmıştır (Lantos ve ark., 2013b).



Resim 3.7. Yaprak kınından ayrılan başaklar (orjinal)



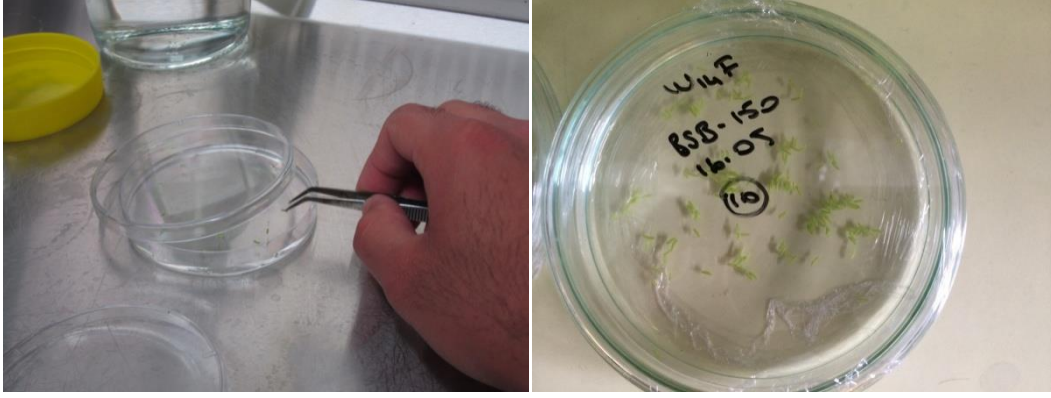
Resim 3.8. Başakların steril su ile yıkanması (orjinal)

3.2.1.6. Anterlerin izolasyonu ve besi ortamına aktarılması

Steril edilen tepe başakçıklardan anterler steril kabin ortamında steril pensler kullanılarak alınmış ve her bir petri kabında ortalama 2 başak ve 100 anter olacak şekilde izole edilerek aktarılmıştır. Çalışmada her genotipten her başlangıç ortamı için 5 petri kabına toplam 500 anter aktarımı yapılmıştır. Daha sonra petri kaplarının yan kısımları streç film ile sarılmıştır. Petri kapları üzerine, besi ortamı, genotip, mutasyon uygulama dozu ve aktarılma tarihi yazılmıştır.



Resim 3.9. Anterlerin başaklardan çıkarılması (orjinal)



Resim 3.10. Anterlerin kaplarına aktarılması (orijinal)

3.2.1.7. Anterlerin inkübasyonu

Anterlerin aktarılması tamamlanan petri kapları 3 gün süre ile 32 °C karanlık ortamda inkübatörde bekletilmiştir. Buradaki amaç anter keselerinin içerisindeki mikrospor bölünmesini artırmak, aynı zamanda da üç gün içerisinde eğer kontaminasyon var ise daha erken dönemde ortaya çıkmasını sağlamaktır (Pauk ve ark., 1995).

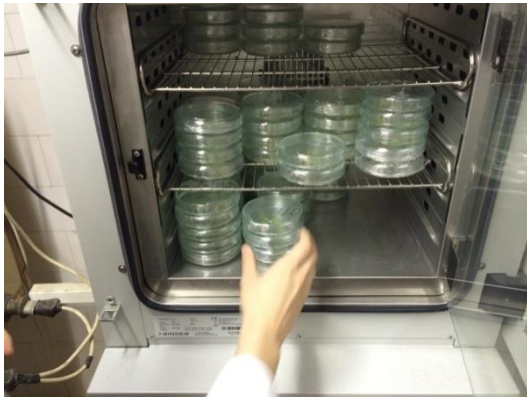
3.2.1.8. Kallusların gelişimi ve rejenerasyon ortamına aktarılması

Anter kültürüne alınan genotiplerin kallus gelişimi ve rejenerasyonu amacı ile kullanılan besi ortamı bileşenleri Çizelge 3.3. te verilmiştir.

Çizelge 3.3. Buğday genotiplerinin kalluslarının aktarıldığı rejenerasyon besi ortamı (Pauk ve ark. 2003)

| Besi ortamı | 190-2 Cu | Besi ortamı | 190-2 Cu |
|---|----------|---------------------------------------|----------|
| KNO ₃ | 1,000 | CaCl ₂ x 2H ₂ O | - |
| KCl | 40 | K ₂ SO ₄ | - |
| NH ₄ H ₂ PO ₄ | - | myo-Inositol | 100 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 200 | Thiamine HCl | 1 |
| NH ₄ NO ₃ | - | Pyridoxine HCl | 0.5 |
| KH ₂ PO ₄ | 300 | Nicotinic acid | 0.5 |
| Ca(NO ₃) ₂ x 4H ₂ O | 100 | D-Biotin | - |
| CoCl ₂ x 6H ₂ O | - | 2,4-D | - |
| MgSO ₄ x 7H ₂ O | 200 | Glycine | 2 |
| Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O | - | Sucrose | 30.000 |
| NA ₂ EDTA | 37.3 | Maltoz | - |
| NA ₂ EDTA x 2H ₂ O | - | Kinetin | 0.5 |
| FeSO ₄ x 7H ₂ O | 27.8 | Folic acid | - |
| MnSO ₄ x 4H ₂ O | 8 | NAA | 0.5 |
| ZnSO ₄ x 7H ₂ O | 3 | Gelrite | 2,800 |
| H ₃ BO ₃ | 3 | Agar | - |
| KI | 0.5 | pH | 5.8 |
| CuSO ₄ x 5H ₂ O | 0.5 | | |

İnkübatörde bekletilme işlemi devam ederken, her gün düzenli olarak kallus kontrolleri yapılmış ve yaklaşık 2 mm büyüklüğüne ulaşan kalluslar steril kabin altında daha önceden hazırlanmış katı 190-2 Cu besi ortamına aktarılmıştır.

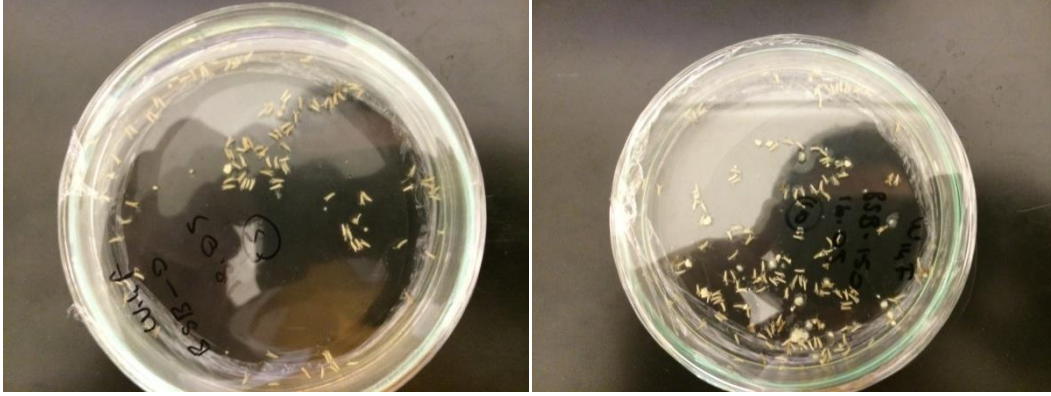


Resim 3.11. İnkübatörlere konulan petri kapları (32 °C ye ayarlanmış) (orijinal)

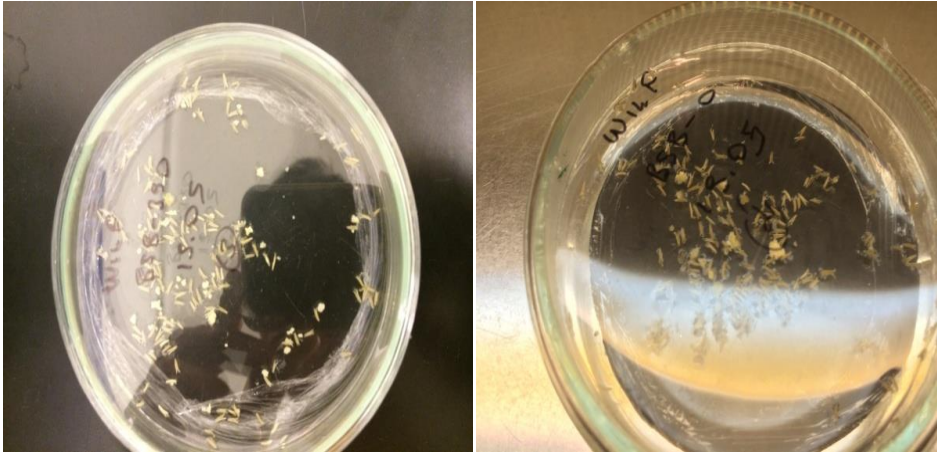
Ardından petri kapları kontrol edilerek 5-6 hafta 28°C süreyle bekletilmeye alınmak üzere inkübatörlere konulmuştur.

3.2.1.9. Kalluslardan gelişen yeşil bitkiciklerin sayılarının belirlenmesi ve test tüplerine aktarılması

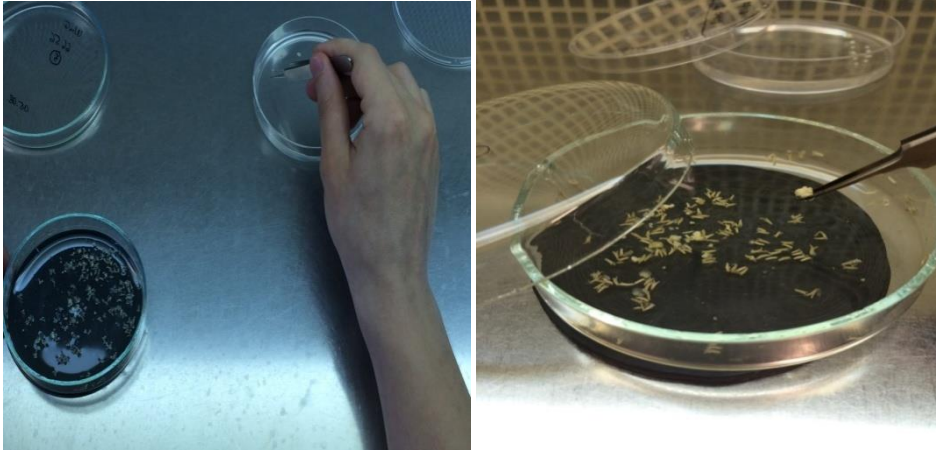
Kallusların aktarıldığı petri kapları 25 °C de 16 saat ışık (50 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$) ve 8 saat karanlık iklim odalarında bitkiler rejenere oluncaya kadar bırakılmış ve bu petri kaplarındaki, kalluslardan gelişim gösteren yeşil bitkicikler, albino bitkicikler tespit edilmiştir.



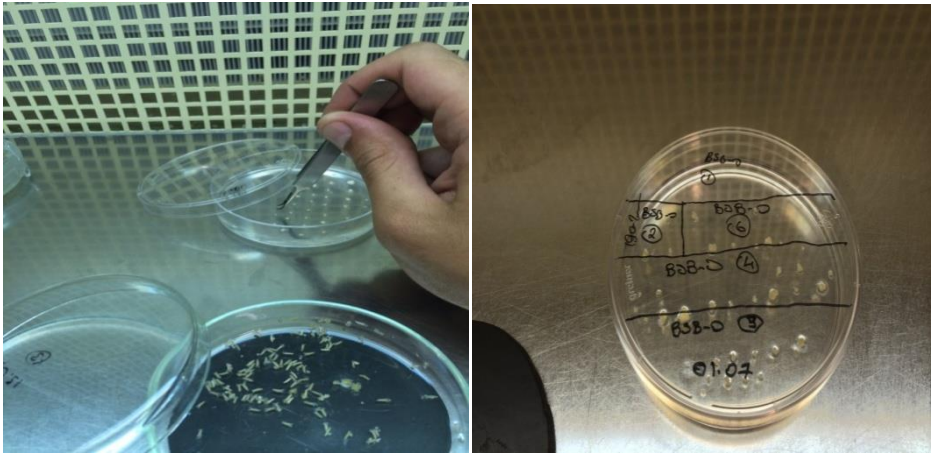
Resim 3.12. Anterlerden gelişen kalluslar (orijinal)



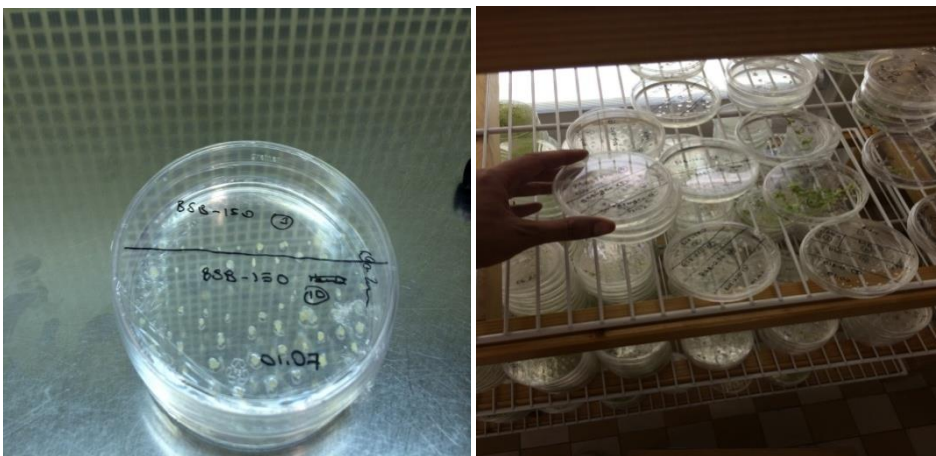
Resim 3.13. Anterlerden gelişen kalluslar (oirjinal)



Resim 3.14. Anterlerden gelişen kallusların aktarılması (orijinal)



Resim 3.15. Anterlerden gelişen aktarımı tamamlanmış kalluslar (orijinal)



Resim 3.16. Anterlerden gelişen aktarımı tamamlanmış kalluslar (orijinal)

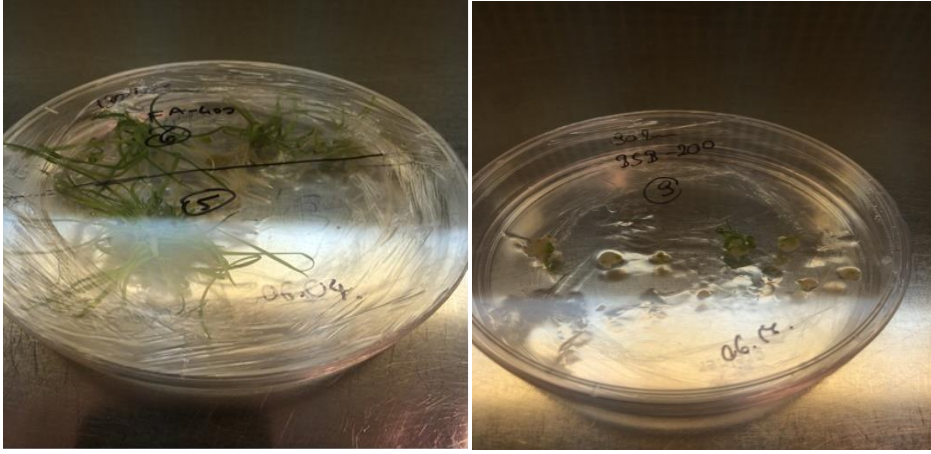


Resim 3.17. Kalluslardan gelişen yeşil bitkiciklerin sayılarının belirlenmesi ve test tüplerine aktarılması (orijinal)

Yapılan gözlemlerde yeşil bitkicik ve albino sayımları yapılmış elde edilen sonuçlar tabloda verilmiştir. Rejenerasyon ortamındaki bitkiler 1-1.5 cm olunca aynı besi ortamını içeren test tüplerine aktarılmıştır.



Resim 3.18. Test tüpünde gelişen albino bitkicik (orijinal)



Resim 3.19. Petri kaplarındaki bitkicikler (orijinal)

Kalluslardan bir kısmı yeşil bitkicik, bir kısmı albino bitkicik üretirken, bazı kalluslar yanıt vermemiştir. Gelişen yeşil ve albino bitkiciklerin sayısı kaydedilmiştir. Yeşil bitkicikler, hazırlanan taze 190-2 Cu besi ortamı bulunan petri kaplarına aktarılıp, daha sonra iklim odasına gönderilmiştir.

Bu petri kaplarında gelişen yeşil bitkicikler, belirli bir gelişimi gösterince hazırlanmış olan test tüplerine (içinde yine taze 190-2 Cu bulunan) aktarılıp, tekrar iklim odasına gönderilmiştir. Rejenerasyon ortamının içeriği bitki büyüme düzenleyicileri dışında aynıdır ve sakaroz oranı % 1.5 azaltılmıştır. Albino bitkicikler ise gerekli sayımları yapıldıktan sonra atılmıştır.



Resim 3.20. Kalluslardan rejenerasyon ortamında gelişen yeşil bitkicikler (orijinal)

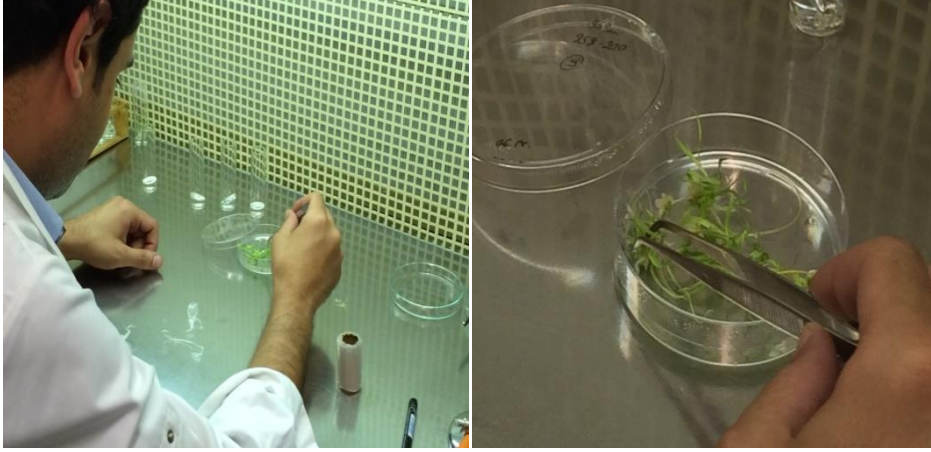


Resim 3.21. Kalluslar ve gelişen yeşil bitkicikler (orijinal)

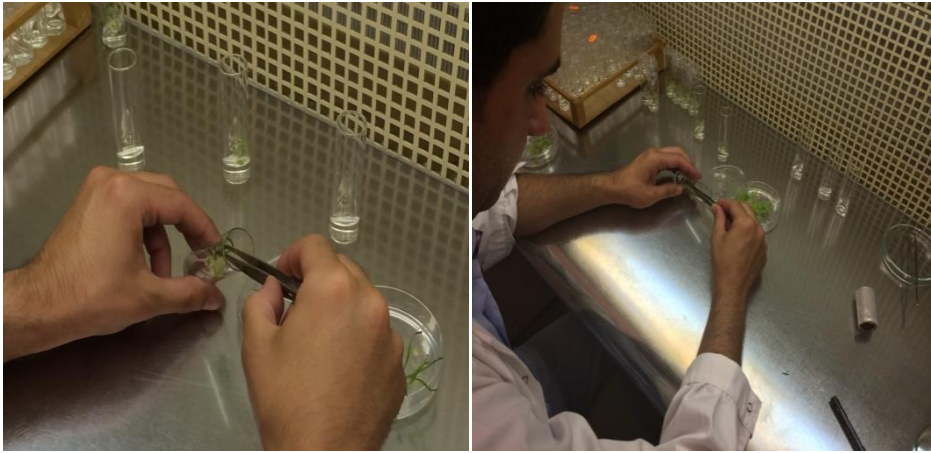
İklim odasına aktarılan kallusların yeşil bitkicik ve albino gözlemleri yapılmıştır. Buradan gelişen ve 1 cm ve daha uzun sürgüne sahip olan yeşil bitkicikler taze besi ortamı bulunan test tüplerine aktarılmıştır.



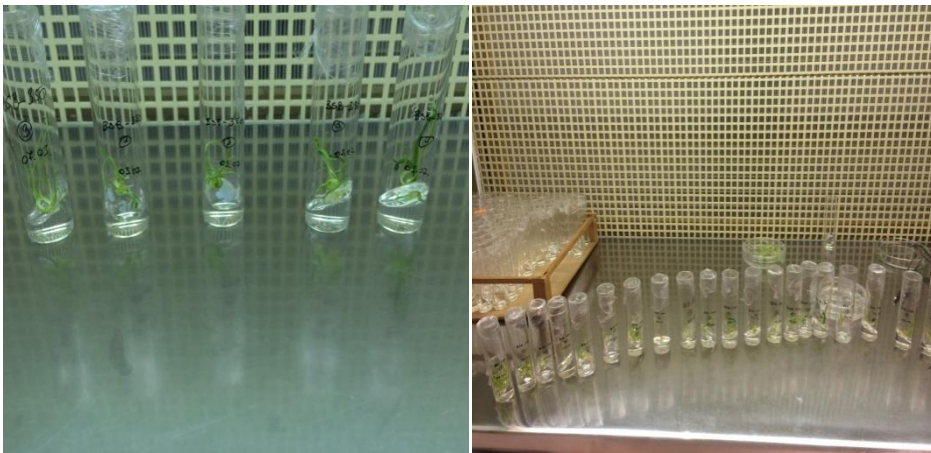
Resim 3.22. 190-2 Cu içeren test tüpleri (orijinal)



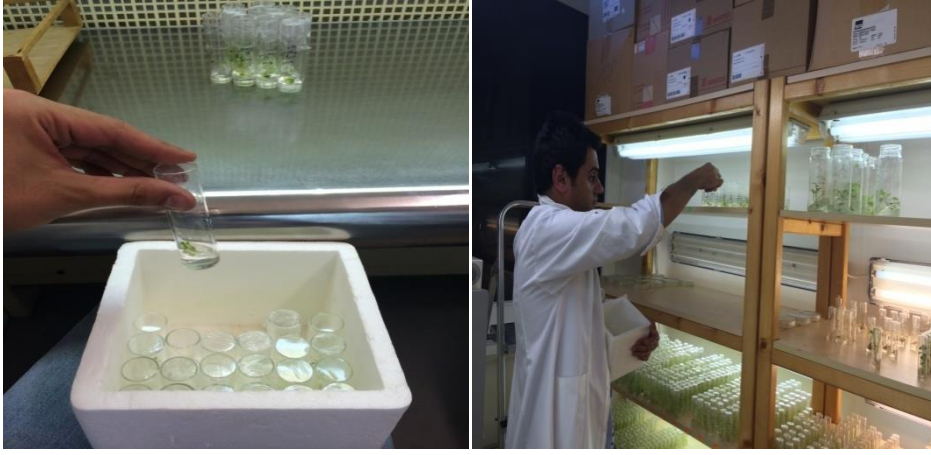
Resim 3.23. Gelişen yeşil bitkiciklerin test tüplerine aktarılması (orijinal)



Resim 3.24. Gelişen yeşil bitkiciklerin test tüplerine aktarılması (orijinal)



Resim 3.25. Test tüplerine aktarılan yeşil bitkicikler (orijinal)



Resim 3.26. Test tüplerine aktarılan yeşil bitkiciklerin iklim odasına taşınması (orijinal)

3.2.1.10. Test tüplerinde gelişen bitkiciklerin toprak bulunan küçük tüplere aktarımı ve vernalizasyon yapılması

Gözlemler yapılarak yeterli kök büyüklüğüne ulaşan bitkicikler ortalama 3 hafta sonunda seraya %30 torf ve %70 kum içeren saksılara aktarılarak 20 °C'de üzerlerine alıştırmak amacı ile 3 ila 5 gün şeffaf bir polietilen torba kapatılarak konulmuştur.

Bitkilerin vernalizasyon ihtiyacını gidermek için soğuk odada (2-4 °C de, 16 saat 62,5 mikromol m⁻² s⁻¹ ışık yoğunluğunda) 5-6 hafta süresince bırakılmıştır.



Resim 3.27. Polietilen torbalar ile kapatılan doubled-haploid bitkiler (orijinal)

Bitkilerin saksılarının üzerini polietilen torba ile kapatılmasında diğer bir amaç nemli bir ortam sağlamaktır. Ayrıca burada bitkilerin ortamın nemli olması için bırakılan yere püskürtme şeklinde su verilmiştir, ortalama nem %70 civarında olmuştur. Bu bitkilerde haploid ve spontan dihaploid olanlar belirlenmiş ve spontan dihaploid olanlar vernalizasyon için ön soğuk uygulaması yapılmış ardından seraya gönderilmiştir.

3.2.1.11. Bitkilerde ploidi düzeyinin belirlenmesi

Bitkilerde ploidi düzeyi farklı yöntemler kullanılarak belirlenmektedir. Fenotipik olarak: Haploid bitkilerin steril kısa ve dar yapraklı çok sayıda haploid küçük salkım ve küçük başakçıklara sahip oldukları gözlenmiştir (Resim 3.28).



Resim 3.28. Fenotipik olarak haploid (önde) ve doubled-haploid bitkiler (Çay, 2012)

Stoma hücrelerine bakılarak: Değişik bitki türlerinde stomaların büyüklüğü ile ploidi düzeyi arasında önemli ilişkiler belirlenmiştir. Haploid bitkilerin stomalarının doubled-haploid bitkilerinkine göre daha küçük olduğu, dolayısıyla birim alanda daha fazla stoma bulunduğu saptanmıştır. Normal diploid bitkilerde stoma hücreleri ölçüldüğünde daha büyük iken, haploid bitkilerde daha küçük olduğu gözlenmiştir (Resim 3.29).



Resim 3.29. Stoma hücrelerine bakarak ploidi düzeyinin belirlenmesi (Çay, 2012)

Kromozom sayımı yapılarak: Bitkilerin genellikle kök uçlarından yapılan kromozom sayımları güvenilirliği en fazla olan yöntemdir. Sağlıklı bir gelişme gösteren taze kök uçlarından alınan örnekler, kromozom sayımları için en uygun materyaldir.

Flow stometri kullanılarak: Diğer yöntemlerin etkili olarak çalışmadığı durumlarda flow sitometri, hücrelerin tek tek floresan dedektörden geçerken emdikleri ışının analizine dayanan bir yöntemdir (ay, 2012).

3.2.1.12. Bitkilerin seraya aktarılması ve hasad edilmesi

Topraklı ortama aktarılan bitkiler gerekli kültürel bakım işleri yapılarak hasada kadar serada gelişmiş, her bitki ayrı ayrı hasat ve harman yapılmıştır. Bu bitkilerden hasat edilen tohumlar ayrı ayrı paketlenerek gelecek yıl için ekime hazırlanmıştır.



Resim 3.30. Seraya aktarılan doubled-haploid bitkiler (orijinal)



Resim 3.31. Hasat zamanında doubled-haploid (a) ve haploid bitkilere ait başaklar (b) (ay, 2012)



Resim 3.32. Seraya aktarılan spontan doubled-haploid bitkiler (orijinal)



Resim 3.33. Bitkilerin hasad edilmesi (orijinal)



Resim 3.34. Elde edilen doubled-haploid başakların harmanlanması (orijinal)



Resim 3.35. Elde edilen dobled-haploid tohumların ertesi yıl ekim için hazırlanması (orijinal)

3.3. İncelenen Özellikler

Yedi farklı mutasyon dozu ve bir kontrol olmak üzere toplam sekiz mutasyon dozunun uygulandığı iki farklı ileri hattın mutasyon dozlarının anter kültürü yanıtı üzerine etkilerinin ortaya konması amacıyla yürütülen bu çalışmada aşağıda verilen özellikler incelenmiştir.

- 1.Kallus sayısı (adet)
2. Albino bitkicik sayısı (adet)
3. Yeşil bitkicik sayısı (adet)
- 4.Seraya Aktratılan Bitki Sayısı (adet)
5. Haploid bitki sayısı (adet)
6. Spontan doubled-haploid bitki sayısı (adet)

3.4. Deneme Deseni ve Verilerin Değerlendirilmesi

Yedi farklı mutasyon dozu ve bir kontrol olmak üzere toplam sekiz mutasyon dozunun uygulandığı iki farklı ileri hattın mutasyon dozlarının anter kültürü yanıtı üzerine etkilerinin ortaya konması amacıyla yürütülen bu çalışma, tesadüf parsellerinde bölünmüş parseller deneme desenine göre deneme planlanmıştır (Düzgüneş ve ark.,1987). Ana-parselleri ileri ekmeklik buğday genotipleri alt-parselleri ise mutasyon dozları oluşturmuştur.

Araştırmada incelenen özelliklere ilişkin elde edilen veriler tesadüf parsellerinde bölünmüş parseller deneme desenine göre MSTAT paket programı kullanılarak analiz edilmiştir. İncelenen özelliklerde genotip ve mutasyon dozları arasındaki ve genotip x mutasyon dozu interaksiyonu ortalamalar arasındaki farklılıklar DUNCAN önemlilik testi kullanılarak belirlenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Bu araştırma, yedi farklı mutasyon dozu ve bir kontrol olmak üzere toplam sekiz mutasyon dozunun uygulandığı iki farklı ileri hattın mutasyon dozlarının anter kültürü yanıtı üzerine etkilerinin ortaya konması amacıyla yürütülmüştür.

Bu amaçla biri kılçıklı diğeri kılçıksız olmak üzere 2 farklı ileri ekmeklik buğday hattının farklı doz uygulamalarından elde edilmiş mutantların M₁ generasyonundaki bitkiler kullanılmıştır. Bu bitkilerin mutasyon dozlarının anter kültürüne yanıtlarının genotipler ile mutasyon dozlarındaki farklılıklar incelenmiştir. Anterlerden gelişen, kallus, albino bitkicik, yeşil bitkicik sayısı, seraya aktarılan bitki sayısı, haploid bitki sayısı ve doubled-haploid bitki sayıları belirlenmiştir (Çizelge 4.1.).

Çizelge 4.1. Kallus oranlarına göre aktarılan yeşil bitki, albino bitki, seraya aktarılan bitki, haploid bitki ve spontan doubled- haploid bitki sayısı

| BSB-0 (tekerrür) | Kallus | Yeşil Bitkicik sayısı | Albino bitkicik sayısı | Seraya aktarılan bitki sayısı | Haploid bitki sayısı | Spontan doubled- haploid bitki sayısı |
|-------------------------------|---------------|--------------------------------------|---------------------------------------|--|---------------------------------|--|
| 1 | 39 | 4 | 16 | 2 | 2 | 1 |
| 2 | 31 | 3 | 6 | 0 | 3 | |
| 3 | 26 | 3 | 10 | 0 | 3 | |
| 4 | 22 | 4 | 6 | 2 | 2 | |
| 5 | 28 | 4 | 17 | 2 | 1 | |
| Toplam | 146 | 18 | 55 | 6 | 11 | |
| (%) oranlar | 29.20 | 12.32 | 37.67 | 4.10 | 7.53 | |
| BSB-100 (tekerrür) | | | | | | 2 |
| 1 | 21 | 5 | 5 | 3 | 2 | |
| 2 | 12 | 5 | 2 | 4 | 1 | |
| 3 | 11 | 8 | 2 | 7 | 1 | |
| 4 | 11 | 4 | 6 | 5 | 0 | |
| 5 | 11 | 6 | 3 | 3 | 3 | |
| Toplam | 66 | 28 | 18 | 17 | 7 | |
| (%) oranlar | 13.20 | 42.42 | 27.27 | 25.75 | 10.60 | |
| BSB-150 (tekerrür) | | | | | | 36 |
| 1 | 95 | 30 | 28 | 19 | 11 | |
| 2 | 90 | 12 | 20 | 10 | 2 | |
| 3 | 75 | 18 | 16 | 8 | 10 | |
| 4 | 70 | 49 | 12 | 13 | 36 | |
| 5 | 61 | 32 | 10 | 16 | 16 | |
| Toplam | 391 | 141 | 86 | 66 | 75 | |

| | | | | | | |
|-------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|----|
| (%) oranlar | 78.20 | 36.06 | 21.99 | 16.87 | 19.18 | |
| BSB-200 (tekerrür) | | | | | 0 | |
| 1 | 72 | 32 | 5 | 6 | 26 | 14 |
| 2 | 58 | 13 | 17 | 3 | 10 | |
| 3 | 46 | 21 | 11 | 19 | 2 | |
| 4 | 33 | 20 | 8 | 2 | 18 | |
| 5 | 28 | 6 | 7 | 5 | 1 | |
| Toplam | 237 | 92 | 48 | 35 | 47 | |
| Yüzde oranlar | 47.40 | 38.81 | 20.25 | 14.76 | 19.83 | |
| BSB-250 (tekerrür) | | | | | | |
| 1 | 39 | 2 | 5 | 0 | 2 | 2 |
| 2 | 35 | 7 | 11 | 5 | 3 | |
| 3 | 24 | 2 | 17 | 0 | 2 | |
| 4 | 32 | 7 | 18 | 4 | 3 | |
| 5 | 33 | 8 | 9 | 6 | 2 | |
| Toplam | 163 | 26 | 60 | 15 | 12 | |
| (%) oranlar | 32.60 | 15.95 | 36.80 | 9.20 | 7.36 | |
| BSB-300 (tekerrür) | | | | | | |
| 1 | 91 | 8 | 14 | 14 | 6 | 25 |
| 2 | 47 | 18 | 6 | 14 | 4 | |
| 3 | 19 | 5 | 8 | 5 | 0 | |
| 4 | 19 | 4 | 12 | 1 | 3 | |
| 5 | 13 | 3 | 2 | 2 | 1 | |
| Toplam | 189 | 38 | 42 | 36 | 14 | |
| (%) oranlar | 37.80 | 20.10 | 22.22 | 19.04 | 7.40 | |
| BSB-350 (tekerrür) | | | | | | |
| 1 | 90 | 8 | 14 | 6 | 2 | 8 |
| 2 | 47 | 18 | 6 | 14 | 4 | |
| 3 | 22 | 5 | 7 | 6 | 1 | |
| 4 | 22 | 4 | 10 | 4 | 0 | |
| 5 | 19 | 5 | 10 | 5 | 0 | |
| Toplam | 200 | 40 | 47 | 35 | 7 | |
| (%) oranlar | 40.00 | 20.00 | 23.50 | 17.50 | 3.50 | |
| BSB-400 (tekerrür) | | | | | | |
| 1 | 22 | 2 | 12 | 0 | 2 | 2 |
| 2 | 24 | 3 | 5 | 0 | 3 | |
| 3 | 19 | 3 | 4 | 1 | 2 | |
| 4 | 18 | 3 | 11 | 0 | 3 | |
| 5 | 16 | 5 | 5 | 0 | 1 | |
| Toplam | 99 | 16 | 37 | 1 | 11 | |
| (%) oranlar | 19.80 | 16.16 | 37.37 | 1.01 | 11.11 | |
| FA-0 (tekerrür) | | | | | | |
| 1 | 46 | 34 | 9 | 10 | 24 | 8 |
| 2 | 20 | 7 | 10 | 6 | 1 | |
| 3 | 13 | 7 | 2 | 5 | 2 | |

| | | | | | | |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|---|
| 4 | 12 | 5 | 4 | 3 | 2 | |
| 5 | 14 | 7 | 2 | 5 | 2 | |
| Toplam | 105 | 60 | 27 | 29 | 31 | |
| (%) oranlar | 21.00 | 57.14 | 25.71 | 27.61 | 29.52 | |
| FA-100 (tekerrür) | | | | | | |
| 1 | 67 | 31 | 19 | 7 | 24 | 4 |
| 2 | 43 | 21 | 11 | 3 | 18 | |
| 3 | 44 | 23 | 12 | 11 | 12 | |
| 4 | 54 | 33 | 15 | 8 | 26 | |
| 5 | 54 | 31 | 9 | 4 | 27 | |
| Toplam | 262 | 139 | 66 | 33 | 107 | |
| (%) oranlar | 52.40 | 53.05 | 25.19 | 12.59 | 40.83 | |
| FA-150 (tekerrür) | | | | | | |
| 1 | 18 | 12 | 2 | 9 | 3 | 5 |
| 2 | 9 | 5 | 3 | 5 | 0 | |
| 3 | 9 | 5 | 2 | 3 | 2 | |
| 4 | 8 | 3 | 2 | 0 | 3 | |
| 5 | 8 | 2 | 2 | 0 | 2 | |
| Toplam | 52 | 27 | 11 | 17 | 10 | |
| (%) oranlar | 10.40 | 51.92 | 21.15 | 32.69 | 19.23 | |
| FA-200 (tekerrür) | | | | | | |
| 1 | 37 | 23 | 12 | 4 | 2 | 2 |
| 2 | 8 | 3 | 2 | 2 | 1 | |
| 3 | 7 | 2 | 2 | 0 | 2 | |
| 4 | 7 | 3 | 2 | 2 | 1 | |
| 5 | 8 | 2 | 2 | 0 | 2 | |
| Toplam | 67 | 33 | 20 | 8 | 8 | |
| (%) oranlar | 13.40 | 49.25 | 29.85 | 11.94 | 11.94 | |
| FA-250 (tekerrür) | | | | | | |
| 1 | 13 | 2 | 2 | 0 | 2 | 2 |
| 2 | 8 | 2 | 2 | 0 | 2 | |
| 3 | 7 | 2 | 2 | 0 | 2 | |
| 4 | 8 | 2 | 2 | 0 | 2 | |
| 5 | 8 | 2 | 2 | 0 | 1 | |
| Toplam | 44 | 10 | 10 | 0 | 9 | |
| (%) oranlar | 8.80 | 22.72 | 22.72 | 0 | 20.45 | |
| FA-300 (tekerrür) | | | | | | |
| 1 | 53 | 29 | 13 | 6 | 22 | 1 |
| 2 | 38 | 23 | 8 | 4 | 19 | |
| 3 | 37 | 18 | 5 | 2 | 2 | |
| 4 | 32 | 27 | 10 | 7 | 13 | |
| 5 | 27 | 15 | 7 | 7 | 8 | |
| Toplam | 187 | 112 | 43 | 26 | 64 | |
| (%) oranlar | 37.40 | 59.89 | 22.99 | 13.90 | 34.22 | |
| FA-350 (tekerrür) | | | | | | |
| 1 | 49 | 15 | 30 | 6 | 24 | 2 |

| | | | | | | |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|---|
| 2 | 48 | 30 | 12 | 6 | 46 | |
| 3 | 10 | 3 | 2 | 0 | 3 | |
| 4 | 10 | 4 | 1 | 3 | 1 | |
| 5 | 8 | 3 | 2 | 1 | 2 | |
| Toplam | 125 | 55 | 47 | 16 | 76 | |
| (%) oranlar | 25.00 | 44.00 | 37.60 | 12.80 | 60.8 | |
| FA-400 (tekerrür) | | | | | | |
| 1 | 48 | 30 | 15 | 6 | 24 | 5 |
| 2 | 48 | 30 | 12 | 6 | 24 | |
| 3 | 48 | 31 | 11 | 7 | 24 | |
| 4 | 41 | 27 | 6 | 10 | 17 | |
| 5 | 38 | 20 | 11 | 5 | 15 | |
| Toplam | 223 | 138 | 55 | 34 | 104 | |
| (%) oranlar | 44.60 | 61.88 | 24.66 | 15.24 | 46.63 | |

4.1. Ekmeklik Buğday İleri Hatlarında Anter Kültürüne Yanıt

4.1.1. Kallus sayısı

Bilindiği üzere bitki doku kültüründe kallus yani düzensiz bölünen hücre topluluğu elde etmek başlıca amaçlardandır. Kallus gen transferi dahil bir çok amaçta kullanılmakta, bu uygulamalardan sonra elde edilen kalluslar örnek olarak hücre süspansiyon kültürü ile çoğaltılabilir ve ya direk bitki rejenarasyonuna bırakılabilirler. Fakat kalluslardan sadece yeşil bitki elde edilememesinin yanında rejenerasyon olmaması, albino bitki elde edilmesi gibi olumsuz sonuçlarda olabilmektedir.

Gerek anter gerek ise diğer bitki doku kültürü uygulamalarında öncelikle olabildiğince yüksek kallus sayısının elde edilmesi amaçlanmaktadır. Çünkü kallus sayısının yüksek olması elde edilecek yeşil bitkicik ve haploid/doubled-haploid bitki sayısının o ölçüde fazla olmasına olanak sağlayacak olması nedeniyle çalışmanın başarısını ve etkinliğini artıracak bir özellik olarak kabul edilmektedir.

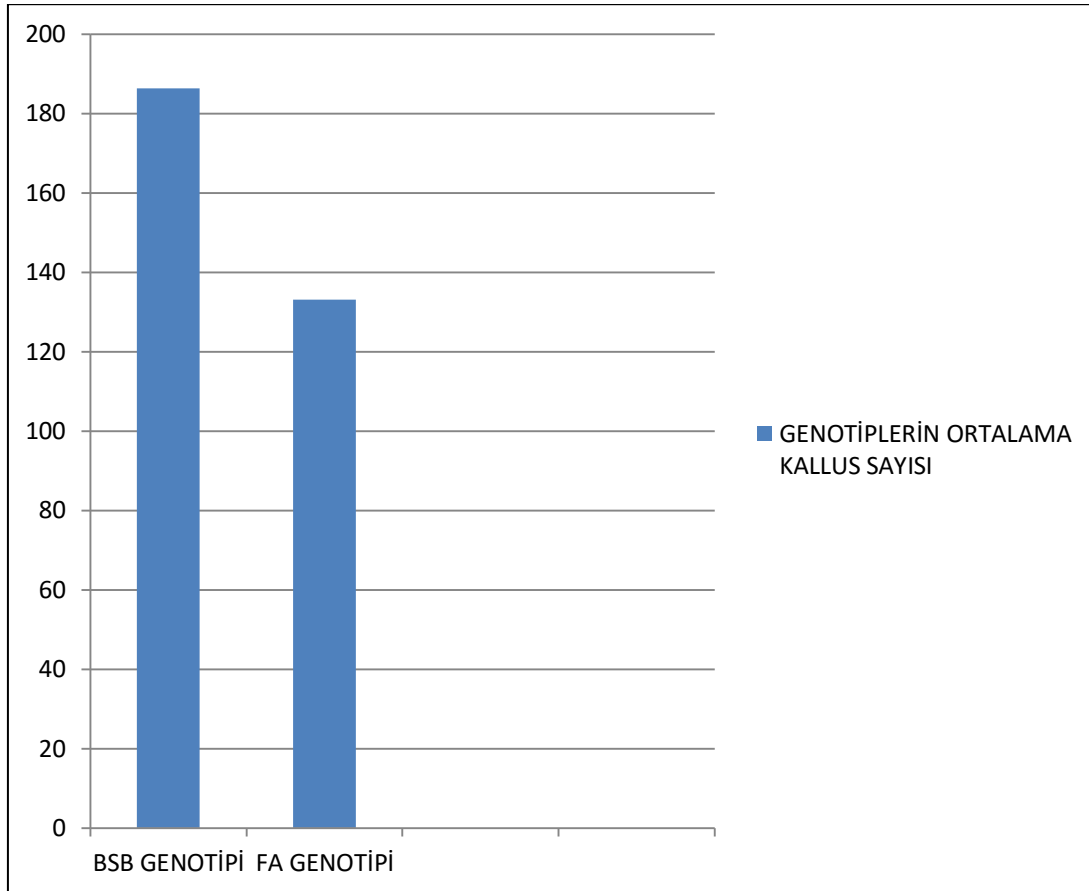
Çalışmada kullanılan İki farklı ekmeklik ileri hattına uygulanan kontrol dahil sekiz farklı mutasyon dozundan elde edilen genotiplerin M₁ generasyonundan alınan anterlerden elde edilmiş olup genotip, mutasyon dozu ve bunların interaksyonuna ait kallus sayıları varyans analizi yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.1.1.1. de verilmiştir.

Çizelge 4.1.1.1. Kallus sayısı özelliği için varyans analiz sonuçları

| Varyasyon Kaynağı | SD | Kareler Toplamı | Kareler Ortalaması | F _{Hesap} |
|--------------------------------------|----|-----------------|--------------------|--------------------|
| Genotip | 1 | 2749,512 | 2749,512 | 2,448 |
| Hata-1 | 8 | 8986,750 | 1123,344 | |
| Mutasyon Dozu | 7 | 3702,887 | 528,984 | 4,210** |
| Genotip x Mutasyon Doz İnteraksiyonu | 7 | 17658,188 | 2522,598 | 20,077** |
| Hata 2 | 56 | 125,644 | 125,644 | |
| Genel | 79 | 40133,388 | 508,018 | |

** ortalamalar arasındaki farklılık 0,01 düzeyinde istatistik olarak önemlidir

Yapılan varyans analizi sonucunda, incelenen genotiplerin kallus sayıları arasındaki farklılıklar istatistik olarak önemsiz bulunurken, genotip x doz interaksiyonu ve mutasyon dozları arasındaki farklılıklar istatistik olarak 0,01 düzeyinde önemli bulunmuştur. İstatistik olarak önemli bulunan ortalamalar arasındaki farklılıkları ortaya koymak için önemlilik testi yapılmış ve sonuçları Çizelge 4.1.1.2 ve 4.1.1.3. te verilmiştir.



Şekil 4.1.1. Kallus sayısı özelliği için genotip ortalamaları

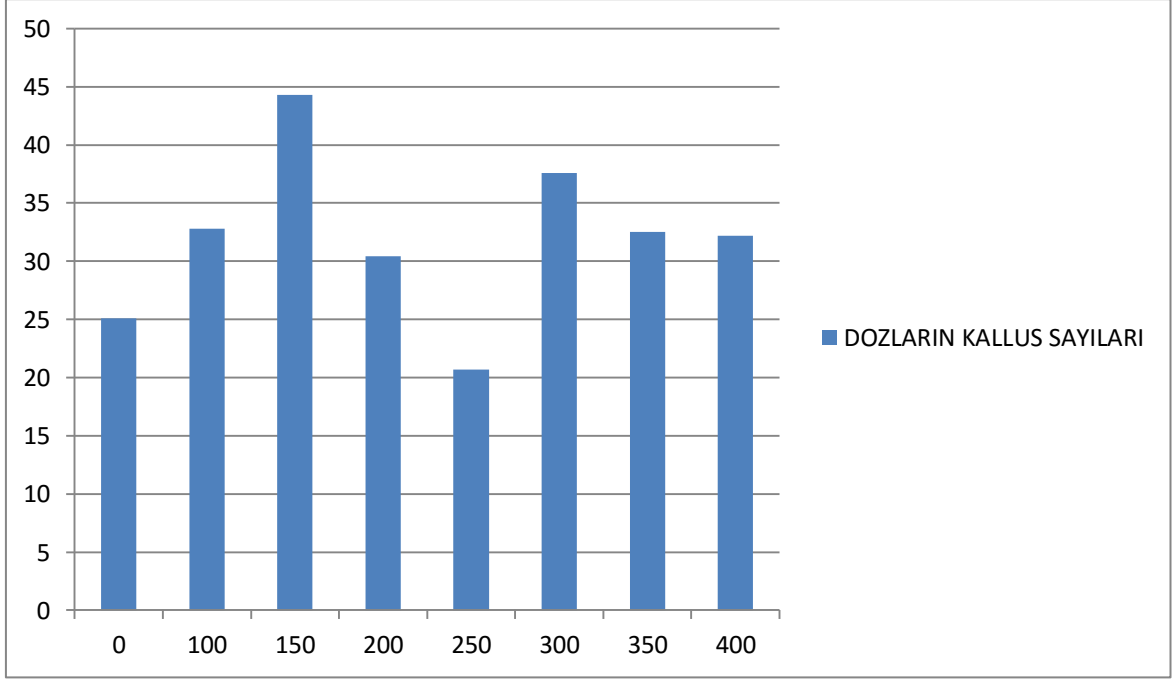
Varyans analizi sonuçları incelendiğinde ekmeklik buğday genotiplerinin ortalama kallus sayıları arasındaki farklılıklar istatistiki anlamda önemli bulunmamıştır. Genotiplerin ortalama kallus sayılarının gösterildiği histogramdan (Şekil 4.1.1.) görüldüğü üzere BSB genotipi ortalama kallus sayısının FA genotipi ortalama kallus sayısından daha fazla olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.1.1.2. Kallus sayısı özelliğine ilişkin mutasyon doz ortalamaları ve önemlilikleri

| Mutasyon Dozu | Ortalama |
|---------------|-----------|
| 150 | 44,30 a |
| 300 | 37,60 ab |
| 100 | 32,80 bc |
| 350 | 32,50 bc |
| 400 | 32,20 bc |
| 200 | 30,40 bcd |
| 0 | 25,10 cd |
| 250 | 20,70 d |

Çizelgenin incelenmesinden toplamda altı istatistiki önemlilik grubunun elde edildiği görülmektedir. İki farklı ekmeklik buğday ileri hattına uygulanan farklı mutasyon dozlarından elde edilen kallus ortalama kallus sayıları 44,30-20,70 arasında değişmiştir.

Dozlara göre yapılan önemlilik testi sonucunda altı farklı istatiki önemlilik grubu elde edilmiştir. Çizelge 4.1.1.2. den mutasyon dozları arasında 150Gy doz, 44,30 ortalama kallus sayısı ile ilk sırada yer almıştır. Bu dozun ardından 300 Gy doz 37,60 ortalama kallus sayısı ile ikinci sırada yer almaktadır. Aynı istatiktiki grupta yer alan 100 Gy ve 350 Gy dozlar sırasıyla 32,80 ve 32,50 ortalama kallus sayısı ile sıralanmışlardır. En düşük kallus sayısı ise 250 Gy dozundan elde edilmiştir (Şekil 4.1.2.).



Şekil 4.1.2. Kallus sayısı özelliği için mutasyon doz ortalamaları

Şekil 4.1.2. incelendiğinde, kallus sayısı 0 Gy dozda başlayarak 150 Gy doza kadar artış göstermiş ve en yüksek değere ulaşmış, daha sonraki mutasyon dozlarında sistematik bir artışın olmadığı ve düzensiz bir kallus sayısının oluşma eğilimi bulunduğu görülmektedir.

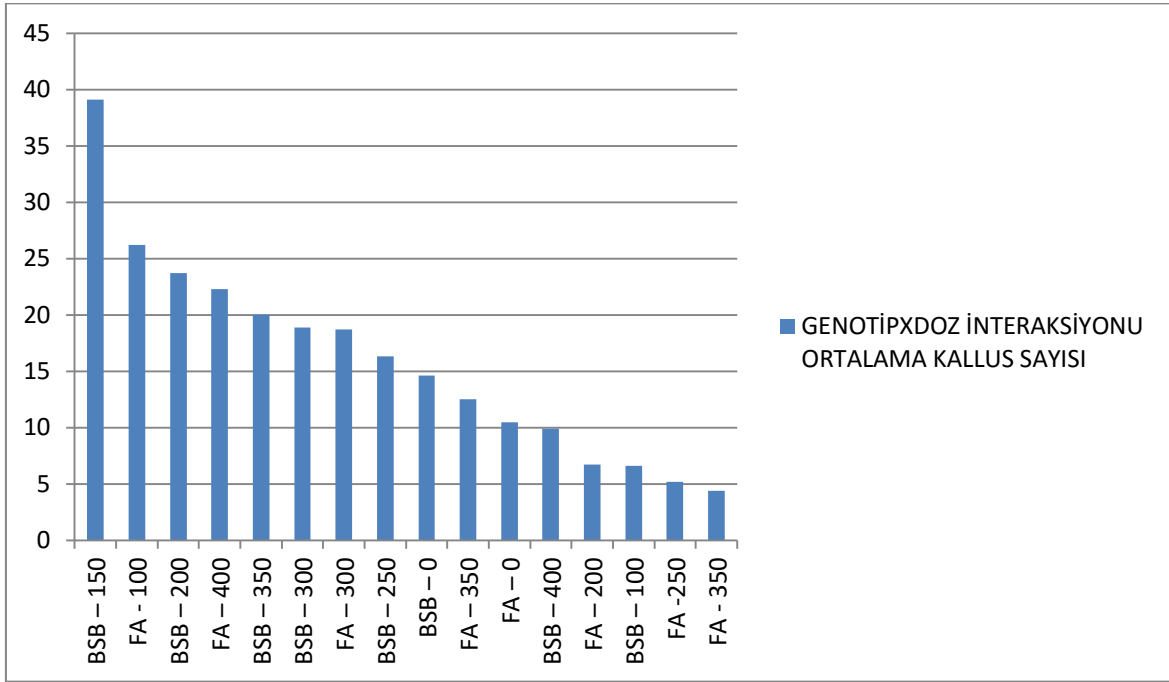
İki farklı ekmeklik buğday ileri hattına uygulanan farklı mutasyon dozları ile elde edilen mutant poplasyonlarından alınan anterlerden gelişen kallus sayısına ilişkin gerçekleştirilen varyans analizi sonucunda genotip x mutasyon doz interaksiyonu istatistiki olarak önemli bulunması nedeniyle yapılan önemlilik testi sonuçları Çizelge 4.1.1.3. te verilmiştir.

Çizelge 4.1.1.3. Kallus sayısı özelliğine ilişkin genotip x doz interaksyonu ve önemlilikleri

| Genotip x Mutasyon Dozu | Ortalama |
|-------------------------|-----------|
| BSB - 150 | 39,10 a |
| FA - 100 | 26,20 ab |
| BSB - 200 | 23,70 b |
| FA - 400 | 22,30 bcd |
| BSB - 350 | 20,00 bcd |
| BSB - 300 | 18,90 bcd |
| FA - 300 | 18,70 bcd |
| BSB - 250 | 16,30 bcd |
| BSB - 0 | 14,60 bcd |
| FA - 150 | 12,50 bcd |
| FA - 0 | 10,50 bcd |
| BSB - 400 | 9,90 bcd |
| FA - 200 | 6,70 cd |
| BSB - 100 | 6,60 cd |
| FA -250 | 5,20 d |
| FA - 350 | 4,40 d |

Çizelgenin incelenmesinden toplamda altı istatistiki önemlilik grubunun elde edildiği görülmektedir. İki farklı ekmeklik buğday ileri hattına uygulanan farklı mutasyon dozları ile elde edilen mutant poplasyonlarından alınan anterlerden gelişen kallus ortalama kallus sayıları 39,10-4,40 arasında değişmiştir.

En yüksek kallus sayısı BSB genotipinin 150 Gy dozundan (39,10 adet) elde edilmiştir. FA genotipi 100 Gy dozu (26,20 adet) ikinci ve BSB genotipinin 200Gy dozu (23.70 adet) üçüncü sırada yer almışlardır. Aynı istatistiki grupta yer alan FA genotipinin 350 ve 250 Gy dozları (4,40adet, 5,20 adet) en düşük kallus sayılarını vermişler ve yine aynı istatistik grupta yer almış olan BSB genotipinin 100 Gy dozu ve FA genotipinin 200 Gy dozu en düşük kallus sayısı veren diğer genotipler olmuştur (Çizelge 4.1.3.; Şekil 4.1.3).



Şekil 4.1.3. Kallus sayısı özelliği için genotip x doz interaksyonu ortalamaları

Şekilden görüldüğü üzere en düşük genotip doz interaksyonu FA- 350 genotipi olup bunu FA- 250 genotipi izlemekte, pik noktada ise BSB - 150 genotipi olduğu görülmektedir.

Kallus sayısı özelliğine ilişkin genel bir değerlendirme yapıldığında; genotipler arasında istatistiki olarak önemli farklar belirlenemesine rağmen, genotip x doz interaksyonu ve mutasyon dozları arasındaki farklılıklar önemli bulunmuştur. Kontrol dahil uygulanan sekiz farklı mutasyon dozu ortalama kallus sayıları 40,30 ile 20,70 adet arasında değişmiş, en yüksek kallus sayısı ortalaması 150 Gy mutasyon dozunda belirlenmiştir. Abdel-Hady ve Ali (2006), 4 ekmeçlik buğday genotipine 150, 250, 350 ve 450 Gy doz uygulanmış M_2 generasyonu tohumlarında en yüksek kallus sayılarının 150 Gy mutasyon dozundan elde edildiğini açıkladığı çalışmalarındaki sonuçları ile elde ettiğimiz sonuçlar benzerlik göstermektedir.

4.1.2. Albino bitkicik sayısı

Tüm bitki doku kültürü uygulamalarında öncelikli amaç kallus sayısının olabildiğince yüksek elde edilmesidir. Ancak, tahıllarda albinizm, anter kültürü yoluyla haploid ve doubled-

haploid bitkilerin elde edilmesinde en büyük sorunlardan biridir. Dolayısıyla, albino bitkicik sayısının olabildiğince düşük olması elde edilecek yeşil bitkicik ve haploid/doubled-haploid bitki sayısının o ölçüde fazla olmasına olanak sağlayacak olması nedeniyle çalışmanın başarısını ve etkinliğini artıracak bir özellik olarak kabul edilmektedir.

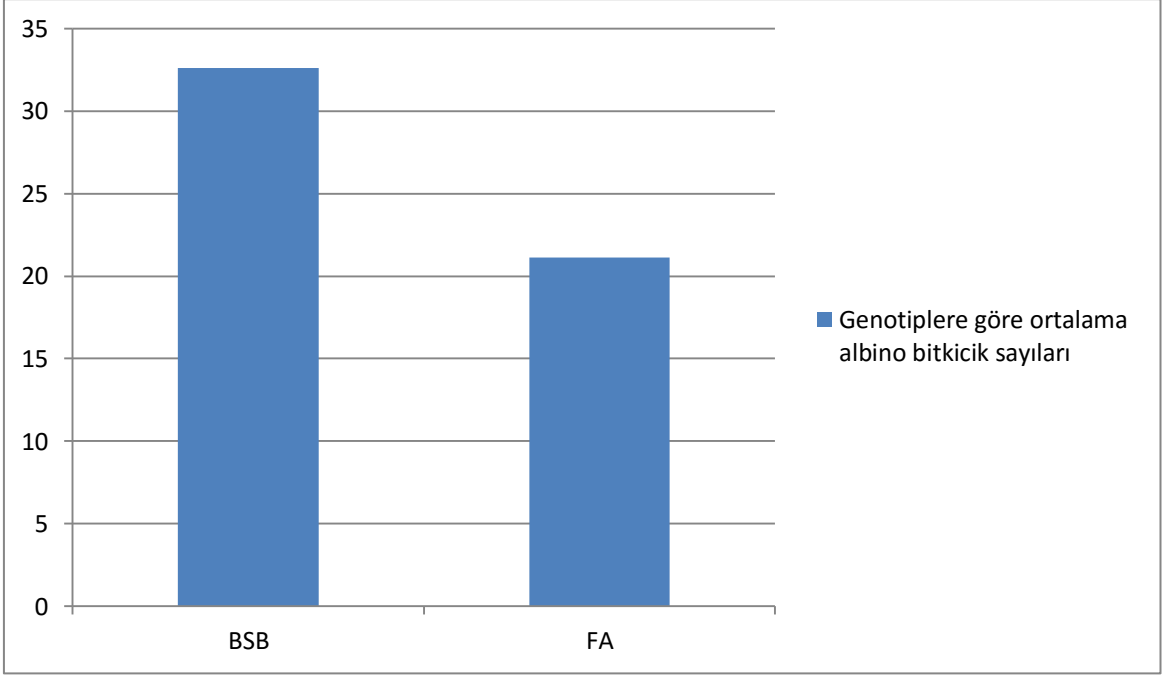
Çalışmada kullanılan iki farklı ekmeklik ileri hattına uygulanan kontrol dahil sekiz farklı mutasyon dozundan elde edilen genotiplerin M₁ generasyonundan alınan anterlerden elde edilen albino bitkicik sayıları üzerinde varyans analizi yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.1.2.1. de verilmiştir.

Çizelge 4.1.2.1. Albino bitkicik sayısı özelliği için varyans analiz sonuçları

| Varyasyon Kaynağı | SD | Kareler Toplamı | Kareler Ortalaması | F _{Hesap} |
|--------------------------------------|----|-----------------|--------------------|--------------------|
| Genotip | 1 | 165,312 | 165,312 | 2,133 |
| Hata-1 | 8 | 222,012 | 77,506 | |
| Mutasyon Dozu | 7 | 620,050 | 13,898 | 0,729 |
| Genotip x Mutasyon Doz İnteraksiyonu | 7 | 97,287 | 129,541 | 6,795** |
| Hata 2 | 56 | 1067,550 | 19,063 | |
| Genel | 79 | 2856,988 | 36,164 | |

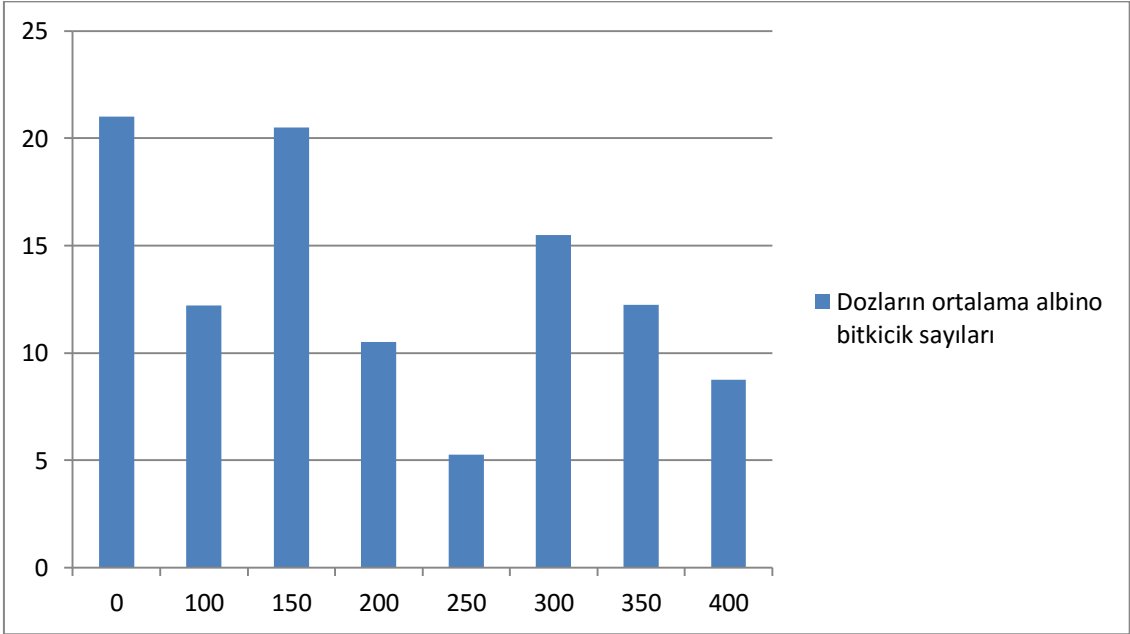
** ortalamalar arasındaki farklılık 0,01 düzeyinde istatistik olarak önemlidir

İki farklı ekmeklik ileri hattına uygulanan kontrol dahil sekiz farklı mutasyon dozundan elde edilen genotiplerin M₁ generasyonundan alınan anterlerden elde edilen albino bitkicik sayıları için yapılan varyans analizi sonucuna göre genotip ve mutasyon dozları arasındaki farklılıklar istatistik olarak önemsiz iken genotip x mutasyon dozu interaksiyonu istatistik olarak 0.01 düzeyinde önemli bulunmuş. Bu da genotiplere uygulanan mutasyon dozlarının albino bitkicik oluşturma oranlarında farklılığın istatistik olarak önemli olmadığını göstermektedir.



Şekil 4.1.4. Albino bitkicik sayısı özelliği için genotip ortalamaları

Varyans analizi sonuçlarına göre genotiplerin ortalama albino bitkicik sayıları arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemsiz bulunmasına karşın, BSB genotipinin albino bitkicik oluşturma yeteneğinin FA genotipine oranla daha yüksek olduğu Şekil 4.1.4. den görülmektedir.



Şekil 4.1.5. Albino bitkicik sayısı özelliği için mutasyon dozu ortalamaları

Varyans analizi sonuçlarına göre genotiplerle birlikte mutasyon dozlarının da ortalama albino bitkicik sayıları arasındaki farklılıklar istatistik olarak önemsiz bulunmasına karşın, kontrol dozu (0 Gy) ve en yüksek kallus sayısının elde edildiği 150 Gy mutasyon dozunda en yüksek albino bitkicik sayısı elde edilmiş, bunları 300 Gy, 350 Gy ve 100 Gy mutasyon dozları izlemiştir. En düşük albino bitkicik sayıları ise 250 Gy mutasyon dozundan elde edilmiştir (Şekil 4.1.4.).

İstatistik olarak önemli bulunan ortalamalar arasındaki farklılıkları ortaya koymak için önemlilik testi yapılmış ve sonuçları Çizelge 4.1.2.2. de verilmiştir.

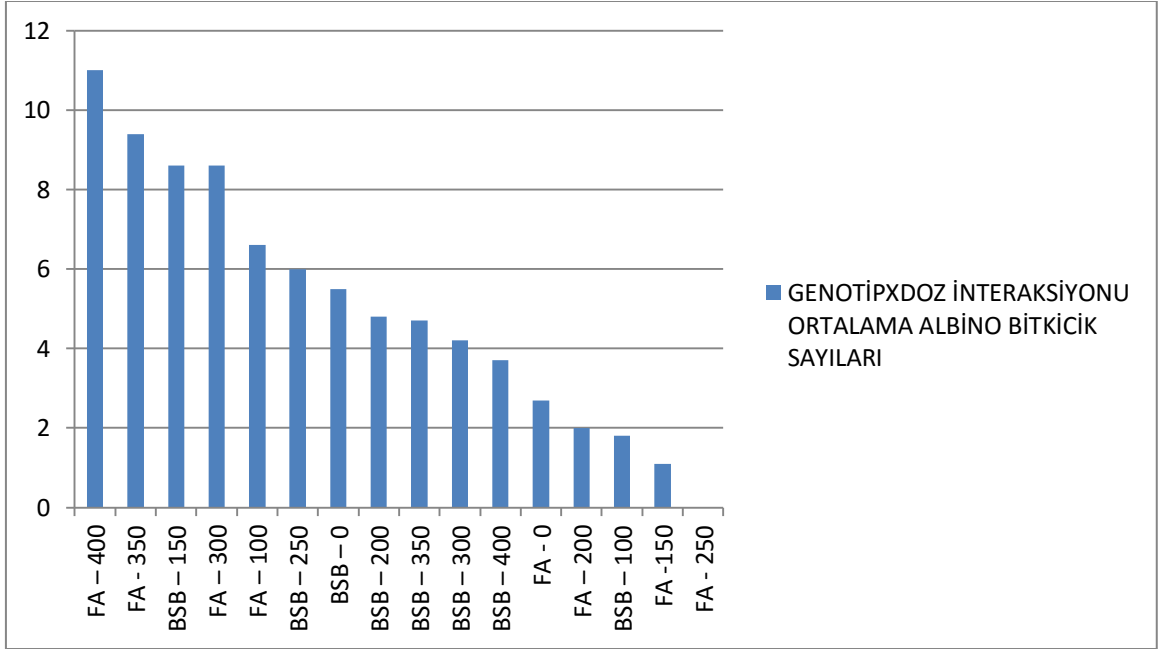
Çizelge 4.1.2.2. Albino bitkicik sayısı özelliğine ilişkin genotip x doz interaksyonu ve önemlilikleri

| Genotip x Mutasyon dozu | Ortalama |
|-------------------------|-----------|
| FA – 400 | 11,00 a |
| FA - 350 | 9,40 ab |
| BSB – 150 | 8,60 abc |
| FA – 300 | 8,60 abc |
| FA – 100 | 6,60 abcd |
| BSB – 250 | 6,00 abcd |
| BSB – 0 | 5,50 abcd |
| BSB – 200 | 4,80 abcd |
| BSB – 350 | 4,70 abcd |
| BSB – 300 | 4,20 abcd |
| BSB – 400 | 3,70 bcd |
| FA - 0 | 2,70 cd |
| FA – 200 | 2,00 d |
| BSB – 100 | 1,80 d |
| FA -150 | 1,10 d |

| | |
|----------|--------|
| FA - 250 | 0,00 d |
|----------|--------|

Çizelgenin incelenmesinden toplamda yedi istatistiki önemlilik grubunun elde edildiği görülmektedir. İki farklı ekmeklik buğday ileri hattına uygulanan farklı mutasyon dozları ile elde edilen mutant poplasyonlarından alınan anterlerden gelişen kalluslardan elde edilen ortalama albino bitkicik sayıları 11,00-0,00 arasında değişmiştir.

En yüksek albino bitkicik sayısı FA genotipinin 400 Gy dozundan (11,00 adet) elde edilmiştir. FA genotipi 350 Gy doz (9,40 adet) ikinci ve aynı istatistiki grupta yer alan BSB genotipinin 150Gy dozu (8,60adet) ve FA genotipinin 300 Gy dozu (8,60 adet) üçüncü sırada yer almışlardır. Aynı istatistiki grupta yer alan FA-100, BSB-250, BSB-0, BSB-200, BSB-350 ve BSB-300 diğer yüksek albino bitkicik sayılarının elde edildiği genotipler olmuştur. En düşük albino bitkicik sayılarının elde edildiği genotip x mutasyon dozu kombinasyonları ise aynı istatistik grupta yer almış olan FA-250, FA-150, BSB-100 ve FA-200 olmuştur. FA genotipinin kontrol dozu (0 Gy) ve BSB genotipinin 400 Gy dozu ise diğer en düşük albino bitkicik sayısını veren kombinasyonlar olmuştur (Çizelge 4.1.2.2.; Şekil 4.1.6).



Şekil 4.1.6. Albino bitkicik sayısı özelliği için genotip x doz interaksiyonu ortalamaları

Görüldüğü üzere on altı farklı kombinasyonda en fazla albino bitkiciği ve en az bitkiciği FA genotipinin 400 Gy ve 250 Gy dozundan elde edilmiştir. FA ve BSB genotiplerinde genelde mutasyon dozlarındaki artışların düzenli olmasa da albino bitkicik sayısında artışlara neden olduğu söylenebilir.

Kalluslardan gelişen albino bitkicik sayısı özelliğine ilişkin genel bir değerlendirme yapıldığında; genotip ve mutasyon dozları arasında farklılıklar istatistiki olarak önemsiz iken, genotip x doz interaksyonu önemli bulunmuştur. Anter kültürü çalışmalarında yanıtı belirleyen en önemli faktörlerden biri genotip olmasına (Barnabas ve ark., 2001) rağmen çalışmamızda genotip etkisinin önemsiz olmasının nedeni az sayıda buğday genotipinin kullanılmış olması olabilir. İki farklı ekmeklik buğday genotipine uygulanan kontrol dahil sekiz farklı mutasyon dozu ortalama albino bitkicik sayıları 0,00 (FA-250) ile 11,00 (FA-400) adet arasında değişmiştir. Elde ettiğimiz bu sonuçlar kalluslardan gelişen albino bitkicik sayısının 0-24 adet arasında bulan El-Hennawy ve ark. (2011) in sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

4.1.3. Yeşil bitkicik sayısı

Kallus sayısının olabildiğince yüksek elde edilmesi tüm bitki doku kültürlerinde öncelikli hedefdir. Buna karşılık albino bitkicik sayısının da olabildiğince düşük olması ve buna karşılık elde edilecek yeşil bitkicik sayısının o ölçüde yüksek olması seraya aktarılacak bitki sayısının ve dolayısıyla haploid/doubled-haploid bitki sayısının o ölçüde fazla olmasına olanak sağlaması açısından oldukça önemli özelliklerden biri olarak kabul edilmektedir.

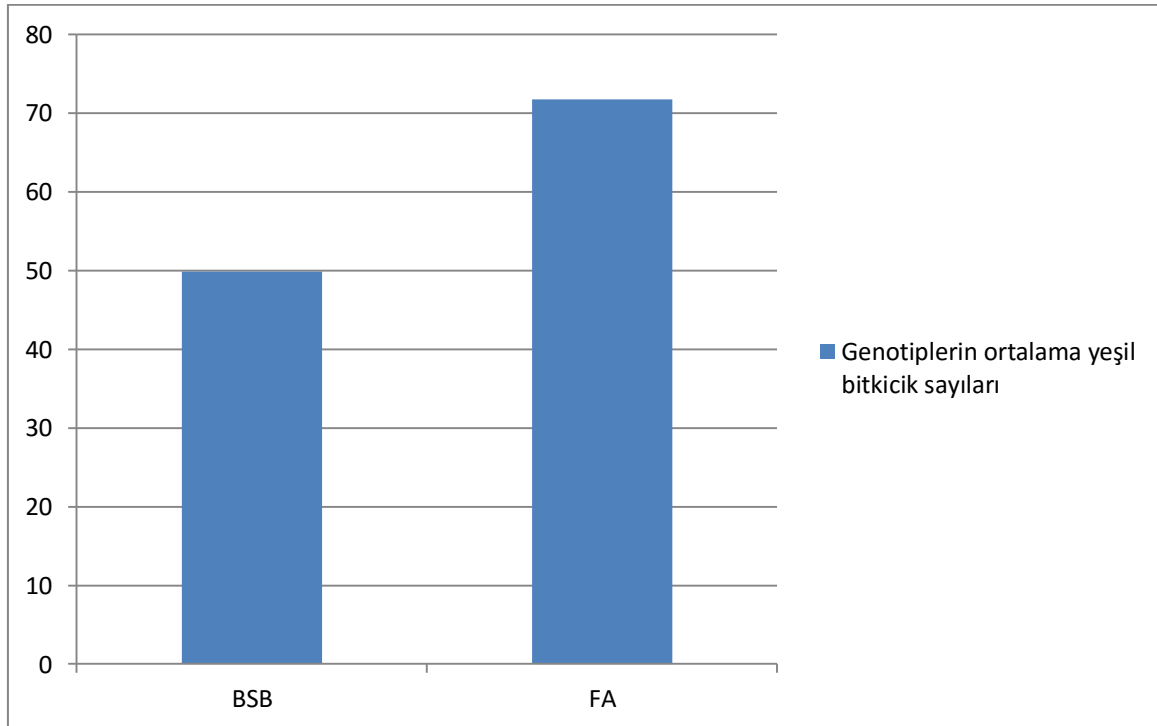
Çalışmada kullanılan iki farklı ekmeklik ileri hattına uygulanan kontrol dahil sekiz farklı mutasyon dozundan elde edilen genotiplerin M₁ generasyonundan alınan anterlerden elde edilen yeşil bitkicik sayıları üzerinde varyans analizi yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.1.3.1. de verilmiştir.

Çizelge 4.1.3.1.Yeşil bitkicik sayısı özelliği için varyans analiz sonuçları

| Varyasyon Kaynağı | SD | Kareler Toplamı | Kareler Ortalaması | F _{Hesap} |
|--------------------------------------|----|-----------------|--------------------|--------------------|
| Genotip | 1 | 255,612 | 255,612 | 2,237 |
| Hata-1 | 8 | 913,950 | 114,244 | |
| Mutasyon Dozu | 7 | 1276,788 | 182,398 | 3,613** |
| Genotip x Mutasyon Doz İnteraksiyonu | 7 | 4147,487 | 592,498 | 11,737** |
| Hata 2 | 56 | 2826,850 | 50,479 | |
| Genel | 79 | 9420,688 | 119,249 | |

** ortalamalar arasındaki farklılık 0,01 düzeyinde istatistik olarak önemlidir

İki farklı ekmeklik ileri hattına uygulanan kontrol dahil sekiz farklı mutasyon dozundan elde edilen genotiplerin M₁ generasyonundan alınan anterlerden gelişen kalluslardan elde edilen yeşil bitkicik sayıları için yapılan varyans analizi sonucuna göre mutasyon dozları arasındaki farklılıklar ile genotip x mutasyon dozu interaksiyonu istatistik olarak 0,01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Genotiplerin yeşil bitkicik sayıları arasındaki farklılıklar ise istatistiki olarak önemsiz olmuştur. Bu da genotiplere uygulanan mutasyon dozlarının yeşil bitkicik oluşturma oranlarında farklılığın istatistik olarak önemli olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.1.7. Yeşil bitkicik sayısı özelliği için genotip ortalamaları

Varyans analizinde istatistiki olarak önemsiz bulunmasına karşılık, FA genotipinin BSB genotipine oranla daha fazla yeşil bitkicik oluşturma eğiliminde olduğu söylenebilir (Şekil 4.1.4).

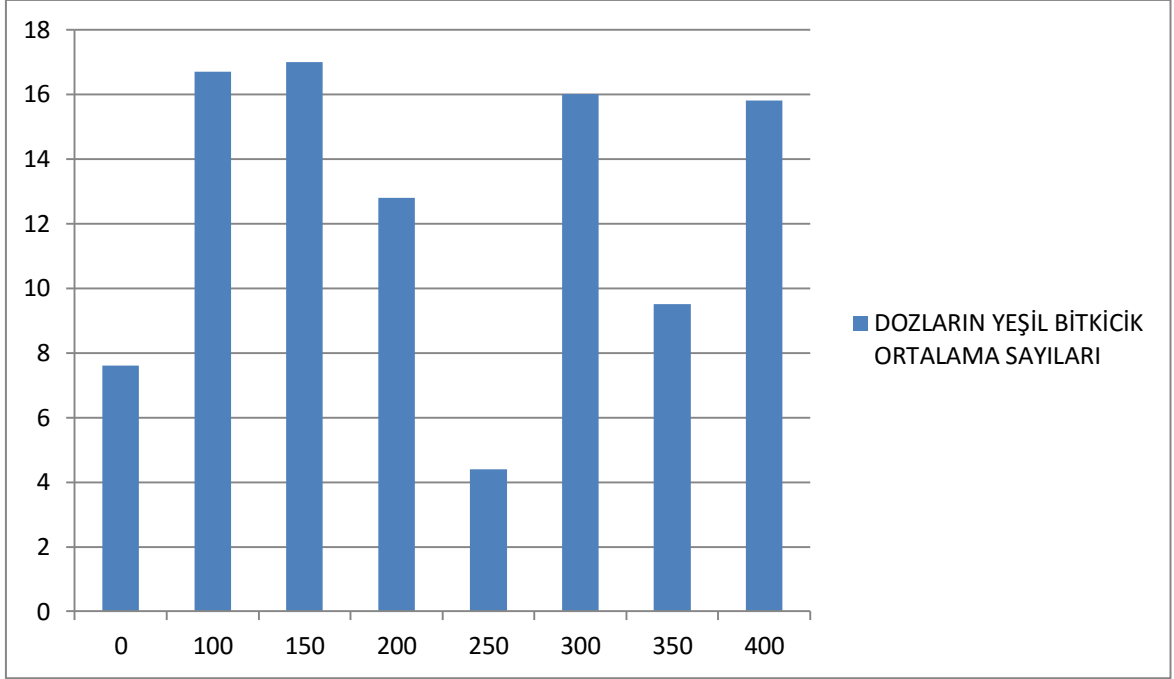
İstatistik olarak önemli bulunan yeşil bitki eldesindeki ortalamalar arasındaki farklılıkları ortaya koymak için önemlilik testi yapılmış ve sonuçları Çizelge 4.1.3.2.ve Çizelge 4.1.3.3. te verilmiştir.

Çizelge 4.1.3.2.Yeşil bitkicik sayısı özelliğine ilişkin mutasyon doz ortalamaları ve önemlilikleri

| Mutasyon Dozu | Ortalama |
|---------------|-----------|
| 150 | 17,00 a |
| 100 | 16,70 a |
| 300 | 16,00 ab |
| 400 | 15,80 ab |
| 200 | 12,80 abc |
| 350 | 9,50 bcd |
| 0 | 7,60 cd |
| 250 | 4,40 d |

Çizelgenin incelenmesinden toplamda altı istatistiki önemlilik grubunun elde edildiği görülmektedir. İki farklı ekmeclik buğday ileri hattına uygulanan farklı mutasyon dozlarından elde edilen ortalama yeşil bitkicik sayıları 17,00-4,40 arasında değişmiştir.

Çizelge 4.1.1.2. den mutasyon dozları arasında aynı istatistik grupta yer alan 150 ve 100 Gy dozları sırasıyla 17,00 ve 16,70 ortalama yeşil bitkicik sayısı ile ilk sırada yer almışlardır. Bu dozun ardından 300 Gy (16,00 adet), 400 Gy (15,80 adet) ve 200 Gy (12,80 adet) dozlar en yüksek yeşil bitkicik sayısının elde edildiği mutasyon dozları olmuştur. En düşük yeşil bitkicik sayıları ise sırasıyla 250 Gy ve kontrol (0 Gy) dozlarından elde edilmiştir (Şekil 4.1.6.).



Şekil 4.1.8. Yeşil bitkicik özelliği için mutasyon doz ortalamaları

Şekil incelendiğinde, kontrol dozdan itibaren 150 Gy mutasyon dozuna kadar yeşil bitkicik sayısının maksimuma ulaştığı görülmektedir. 150 Gydan sonra 250 Gy dozda en düşük yeşil bitkicik sayısının elde edildiği ve birlikte 300 Gy doz da yine bir artış görülmektedir.

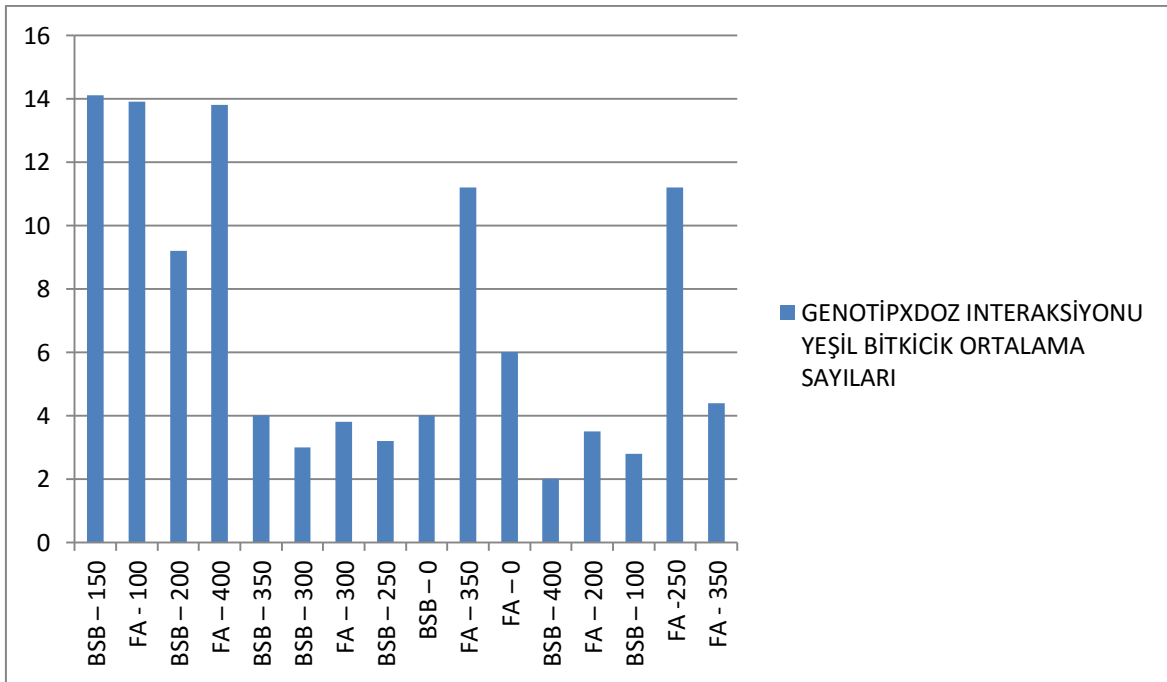
Çizelge 4.1.3.3.Yeşil bitkicik sayısı özelliğine ilişkin genotip x mutasyon doz ortalamaları ve önemlilikleri

| Genotip x Mutasyon Dozu | Ortalama |
|-------------------------|-----------|
| BSB - 150 | 14,10 a |
| FA - 100 | 13,90 a |
| FA - 400 | 13,80 ab |
| FA - 250 | 11,20 abc |
| FA – 350 | 11,20 abc |
| BSB - 200 | 9,20 abc |
| FA - 0 | 6,00 abc |
| BSB - 0 | 4,00 abc |
| BSB - 350 | 4,00 abc |
| BSB - 300 | 3,80 abc |
| FA - 200 | 3,50 abc |
| BSB - 250 | 3,20 bc |
| FA - 300 | 3,00 c |
| FA - 150 | 2,90 c |
| BSB - 100 | 2,80 c |
| BSB - 400 | 2,00 c |

Çizelgenin incelenmesinden toplamda beş istatistiki önemlilik grubunun elde edildiği görülmektedir. İki farklı ekmeklik buğday ileri hattına uygulanan farklı mutasyon dozları ile elde edilen mutant poplasyonlarından alınan anterlerden gelişen kalluslardan oluşan ortalama yeşil bitkicik sayıları 14,10-2,00 arasında değişmiştir.

Yeşil bitkicik sayısı özelliği açısından istatistiki olarak önemli bulunan genotip x mutasyon dozu interaksyonu için yapılan çoklu karşılaştırma testi sonucunda, en yüksek

yeşil bitkicik ortalama sayısı aynı istatistik grupta yer alan BSB genotipinin 150 Gy dozunda ve FA genotipinin 100 Gy dozunda sırasıyla 14,10 ve 13,90 adet yeşil bitkicik ortalama sayısı ile elde edilmiştir. FA genotipinin 450 Gy dozu 13,80 adet yeşil bitkicik ortalama sayısı ile diğer en yüksek değere sahip kombinasyon olmuştur. En düşük yeşil bitkicik sayıları aynı istatistik grupta yer almış olan sırasıyla BSB-400 (2,00 adet), BSB-100 (2,80 adet), FA-150 (2,90 adet) ve FA-300 (3,00 adet) kombinasyonlarından elde edilmiştir.



Şekil 4.1.9. Yeşil bitkicik özelliği için genotipxdoz interaksiyonu ortalamaları

Grafikten anlaşılacağı üzere BSB genotipinden 150 Gy dozda en yüksek yeşil bitkicik elde olunur iken, BSB genotipi en düşük yeşil bitkicik sayısı 400 Gy dozda elde edilmiştir. FA genotipi en yüksek yeşil bitkicik yanıtını 100 Gy dozda verirken, BSB genotipinin aksine genotip x doz interaksiyonu bazında en yüksek yanıtı 400 Gy dozda vermiştir.

Kalluslardan gelişen yeşil bitkicik sayısı özelliğine ilişkin genel bir değerlendirme yapıldığında; genotipler arasında istatistiki olarak önemli farklar belirlenemesine rağmen, genotip x doz interaksiyonu ve mutasyon dozları arasındaki farklılıklar önemli bulunmuştur. Anter kültürü çalışmalarında yanıtı belirleyen en önemli faktörlerden biri genotip olmasına (Barnabas ve ark., 2001; Konieczny ve ark., 2003) rağmen çalışmamızda genotip etkisinin

önemsiz olmasının nedeni az sayıda buğday genotipinin kullanılmış olması olabilir. Kontrol dahil uygulanan sekiz farklı mutasyon dozu ortalama kallus sayıları 4,40 ile 17,00 adet arasında değişmiş, en yüksek kallus sayısı ortalaması 150 Gy mutasyon dozunda belirlenmiştir. İki farklı ekmeklik buğday genotipine uygulanan kontrol dahil sekiz farklı mutasyon dozu ortalama yeşil bitkicik sayıları 14,10 (BSB-150) ile 2,00 (BSB-400) adet arasında değişmiştir. Hatipoğlu ve ark. (1994) tarafından %0-%13 arasında ve El-Hennawy ve ark. (2011) tarafından 0-10 adet arasında belirlenen yeşil bitkicik sayısı değerleri ile çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar arasında benzerlikler bulunmaktadır.

4.1.4. Seraya aktarılan bitki sayısı

Tüm bitki doku kültürü uygulamalarında öncelikli amaç kallus sayısının olabildiğince yüksek elde edilmesidir. Buna karşılık yeşil bitkicik, seraya aktarılan bitki sayısının da o ölçüde yüksek olması elde edilecek haploid/doubled-haploid bitki sayısının o ölçüde fazla olmasına olanak sağlayacak olması nedeniyle çalışmanın başarısını ve etkinliğini artıracak bir özellik olarak kabul edilmektedir.

Çalışmada kullanılan iki farklı ekmeklik ileri hattına uygulanan kontrol dahil sekiz farklı mutasyon dozundan elde edilen genotiplerin M₁ generasyonundan alınan anterlerden elde edilen kalluslardan oluşan yeşil bitkilerden gelişen ve seraya aktarılan bitki sayıları üzerinde varyans analizi yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.1.4.1. de verilmiştir.

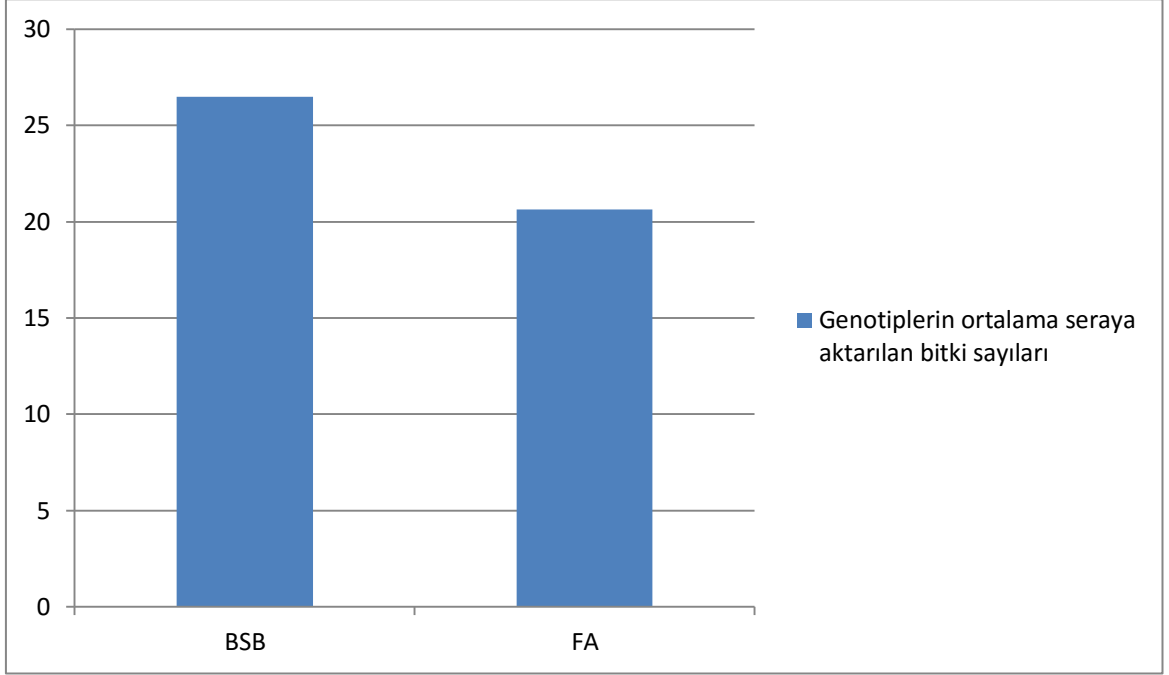
Çizelge 4.1.4.1. Seraya aktarılan bitki sayısı özelliği için varyans analiz sonuçları

| Varyasyon Kaynağı | SD | Kareler Toplamı | Kareler Ortalaması | F _{Hesap} |
|--------------------------------------|----|-----------------|--------------------|--------------------|
| Genotip | 1 | 46,513 | 46,513 | 4,617 |
| Hata-1 | 8 | 80,600 | 10,075 | |
| Mutasyon Dozu | 7 | 234,087 | 33,441 | 2,953** |
| Genotip x Mutasyon Doz İnteraksiyonu | 7 | 428,588 | 61,227 | 5,406** |
| Hata 2 | 56 | 634,200 | 11,325 | |
| Genel | 79 | 1423,988 | 18,025 | |

** ortalamalar arasındaki farklılık 0,01 düzeyinde istatistik olarak önemlidir

Kalluslardan elde edilen seraya aktarılan bitki sayısı özelliği için yapılan varyans analizi sonucuna göre mutasyon dozları arasındaki farklılıklar ile genotip x mutasyon dozu

interaksiyonu istatistik olarak 0,01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Genotiplerin seraya aktarılan bitki sayıları arasındaki farklılıklar ise istatistik olarak önemli bulunmamıştır. Bu da genotiplere uygulanan mutasyon dozlarının seraya aktarılan bitki sayıları arasındaki farklılığın istatistik olarak önemli olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.1.10. Seraya aktarılan bitki sayısı özelliği için genotip ortalamaları

Yapılan varyans analizi sonucunda seraya aktarılan bitki sayılarında istatistik olarak önemli farklılık olmamasına rağmen, BSB genotipinden FA genotipine oranla daha fazla seraya aktarılan bitki sayısına sahip olduğu Şekil 4.1.10. dan görülmektedir.

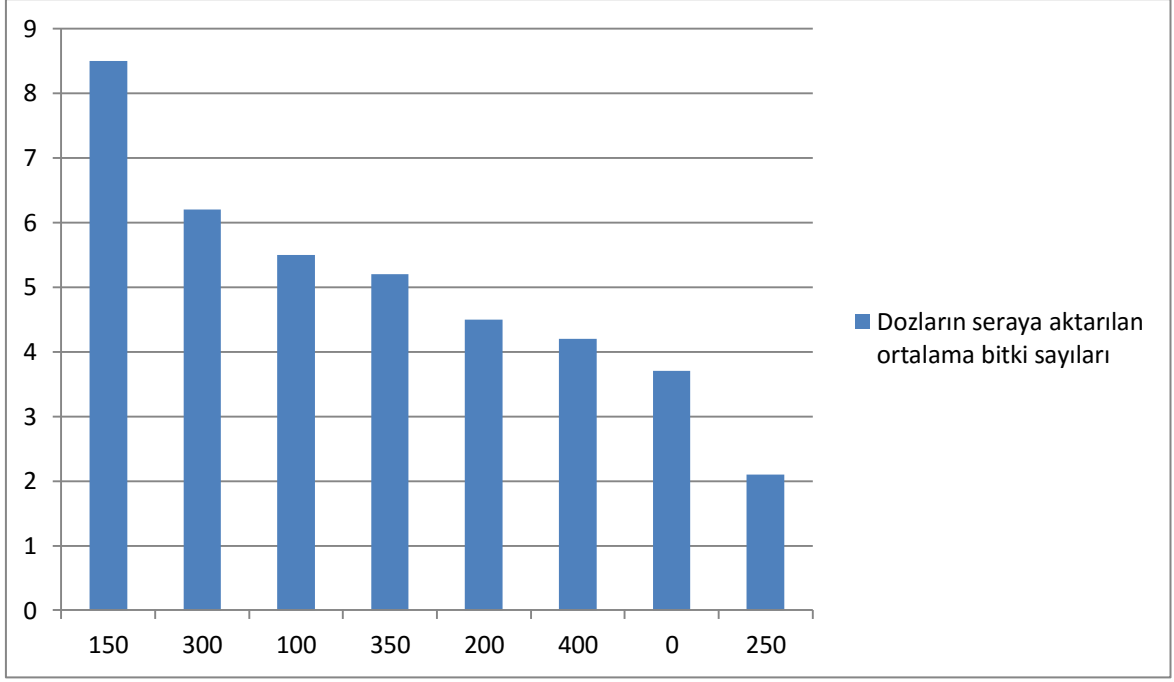
Seraya aktarılan bitki sayısı özelliğine ilişkin yapılan varyans analiz tablosunda istatistik olarak önemli bulunan mutasyon dozu, genotip x mutasyon dozu interaksiyonu ortalamaları arasındaki farklılıkları ortaya koymak için Duncan önemlilik testi yapılmış ve sonuçları Çizelge4.1.4.2. ve 4.1.4.3. de verilmiştir.

Çizelge 4.1.4.2. Seraya aktarılan bitkicik sayısı özelliğine ilişkin mutasyon dozu ortalamaları ve önemlilikleri

| Mutasyon Dozu (Gy) | Ortalama |
|---------------------|----------|
| 150 | 8,50 a |
| 300 | 6,20 ab |
| 100 | 5,50 abc |
| 350 | 5,20 bc |
| 200 | 4,50 bc |
| 400 | 4,20 bc |
| 0 | 3,70 bc |
| 250 | 2,10 c |

Seraya aktarılan bitki sayısı özelliğine ilişkin yapılan varyans analiz tablosunda istatistiki olarak önemli bulunan mutasyon dozu için gerçekleştirilen önemlilik testi sonucunda toplamda beş istatistiki önemlilik grubu elde edilmiştir. İki farklı ekmeçlik buğday ileri hattına uygulanan farklı mutasyon dozlarından elde edilen ortalama seraya aktarılan bitkicik sayıları 8,50-2,10 adet arasında değişmiştir.

Çizelge 4.1.1.2. den mutasyon dozları arasında 150 Gy dozu 8,50 adet ortalama seraya aktarılan bitki sayısı ile ilk sırada yer aldığı anlaşılmaktadır. Bu dozun ardından 300 Gy (6,20 adet) ve 100 Gy (5,50 adet) dozları en yüksek seraya aktarılan bitki sayılarının elde edildiği mutasyon dozları olmuştur. En düşük seraya aktarılan bitki sayısı ise 250 Gy (2,10 adet) dozundan elde edilmiştir (Şekil 4.1.10.).



Şekil 4.1.11. Seraya aktarılan bitki sayısı özelliği için mutasyon dozu ortalamaları

Şekil 4.1.11. incelendiğinde, kontrol dozundan sonra 150 Gy mutasyon dozunda seraya aktarılan bitki sayısının maksimuma ulaştığı görülmektedir. 150 Gy dan sonra 250 Gy doz (en düşük seraya aktarılan bitki sayısı) hariç diğer mutasyon dozlarında seraya aktarılan bitki sayılarının genelde azaldığı görülmektedir.

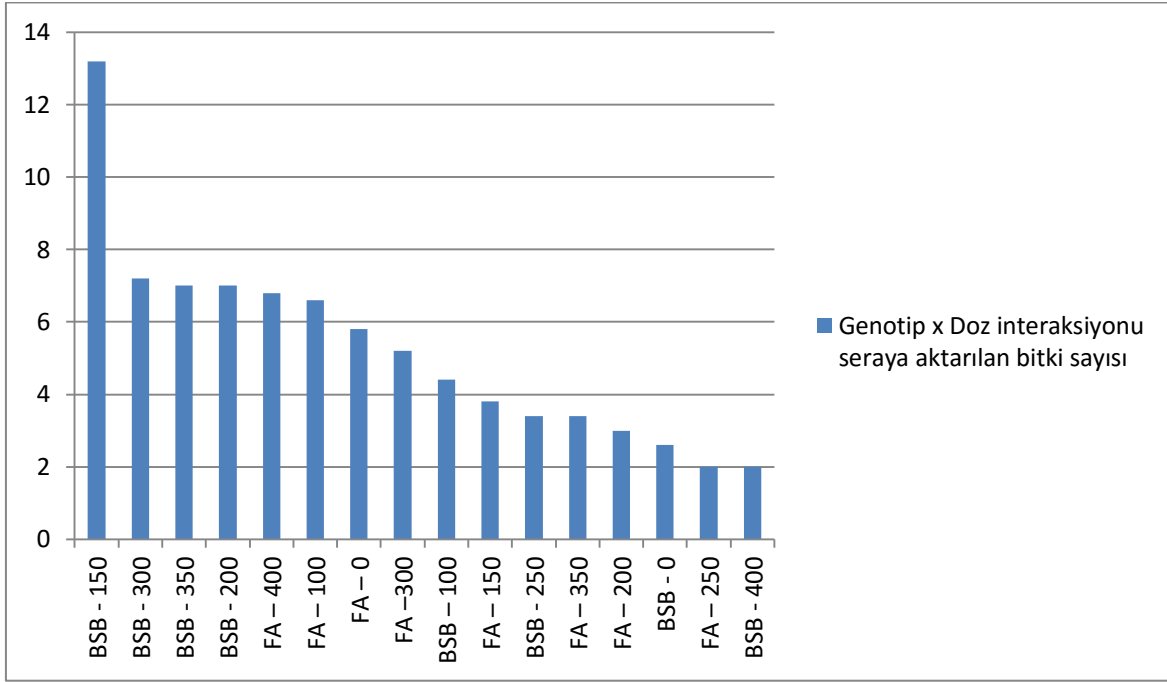
Çizelge 4.1.4.3. Seraya aktarılan bitki sayısı özelliğine ilişkin genotip x mutasyon dozu ortalamaları ve önemlilikleri

| Genotip x Mutasyon Dozu | Ortalama |
|-------------------------|-----------|
| BSB - 150 | 13,20 a |
| BSB - 300 | 7,20 b |
| BSB - 350 | 7,00 bc |
| BSB - 200 | 7,00 bc |
| FA - 400 | 6,80 bc |
| FA - 100 | 6,60 bc |
| FA - 0 | 5,80 bcd |
| FA - 300 | 5,20 bcd |
| BSB - 100 | 4,40 bcde |
| FA - 150 | 3,80 bcde |
| BSB - 250 | 3,40 bcde |
| FA - 350 | 3,40 bcde |
| FA - 200 | 3,00 cde |
| BSB - 0 | 2,60 de |
| FA - 250 | 2,00 e |
| BSB - 400 | 2,00 e |

Çizelgenin incelenmesinden toplamda sekiz farklı istatistiki önemlilik grubunun elde edildiği görülmektedir. İki farklı ekmeklik buğday ileri hattına uygulanan farklı mutasyon dozları ile elde edilen mutant poplasyonlarından alınan anterlerden gelişen yeşil bitkiciklerden ortalama seraya aktarılan yeşil bitki sayıları 13,20-2,00 arasında değişmiştir.

En yüksek seraya aktarılan bitki sayısı BSB genotipinin 150 Gy dozundan (13,20 adet) elde edilmiştir. Sırasıyla, BSB-300, BSB-350, BSB-200, FA-400 ve FA-100 genotip x mutasyon dozu kombinasyonları diğer en yüksek seraya aktarılan bitki sayılarını veren

kombinasyonlar olmuştur. Aynı istatistiki grupta yer alan BSB genotipinin 400 Gy ve FA genotipinin 250 Gy dozları en düşük seraya aktarılan bitkicik sayılarını vermişlerdir. BSB genotipinin 0 Gy dozu ve FA genotipinin 250 Gy dozu en düşük setaya aktarılan bitki sayısını veren diğer kombinasyonlar olmuştur (Çizelge 4.1.4.3.; Şekil 4.1.11).



Şekil 4.1.12. Seraya aktarılan bitki özelliği için genotip x doz etkileşimi ortalamaları

Şekilden görüldüğü üzere en düşük genotip doz etkileşimi BSB - 400 genotipi olup bunu FA - 250 genotipi izlemekte, pik noktada ise BSB - 150 genotipi olduğu görülmektedir.

Kalluslardan gelişen yeşil bitkiciklerden seraya aktarılan bitki sayısı özelliğine ilişkin genel bir değerlendirme yapıldığında; genotipler arasında istatistiki olarak önemli farklar belirlenemesine rağmen, genotip x doz etkileşimi ve mutasyon dozları arasındaki farklılıklar önemli bulunmuştur. Anter kültürü çalışmalarında yanıtı belirleyen en önemli faktörlerden biri genotip olmasına (Barnabas ve ark., 2001) rağmen çalışmamızda genotip etkisinin önemsiz olmasının nedeni az sayıda buğday genotipinin kullanılmış olması olabilir. Kontrol dahil uygulanan sekiz farklı mutasyon dozu ortalama yeşil bitkicik 8,50 ile 2,10 adet arasında değişmiş, en yüksek seraya aktarılan yeşil bitki sayısı ortalaması 150 Gy mutasyon

dozunda belirlenmiştir. İki farklı ekmeklik buğday genotipine uygulanan kontrol dahil sekiz farklı mutasyon dozu ortalama yeşil bitkicik sayıları 13,20 (BSB-150) ile 2,00 (BSB-400) adet arasında değişmiştir. Elde ettiğimiz bu sonuçlar Khiabani ve ark. (2008) tarafından 2,46-26,12 adet ve Lashermes ve ark. (1991) tarafından %0,3 ile %22,4 olarak belirlenen seraya aktarılan yeşil bitki sayısı değerleri ile benzerlikler bulunmaktadır.

4.1.5. Haploid bitki sayısı

Yoğun olarak buğday ıslahı programlarında uygulanan anter kültürü çalışmalarında hedeflenen haploid bitki sayısının teorik olarak yüksek olması arzu edilir. Haploid bitkiler fertil olmadığı için uygun zamanda kromozom sayısının katlanarak fertil doubled-haploid bitkilerin elde edilmesi gerekir.

Çalışmada kullanılan iki farklı ekmeklik ileri hattına uygulanan kontrol dahil sekiz farklı mutasyon dozundan elde edilen genotiplerin M_1 generasyonundan alınan anterlerden elde edilen kalluslardan gelişen yeşil bitkiciklerden elde edilen haploid bitki sayıları üzerinde varyans analizi yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.1.5.1. de verilmiştir.

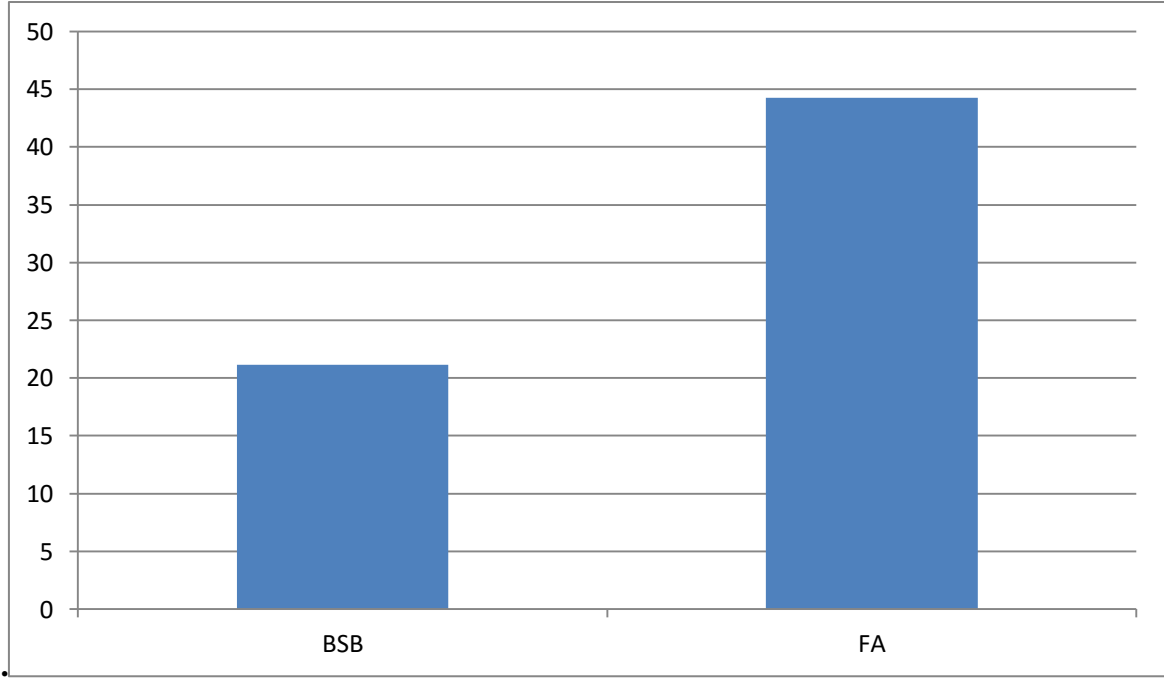
Çizelge 4.1.5.1. Haploid bitki sayısı özelliği için varyans analiz sonuçları

| Varyasyon Kaynağı | SD | Kareler Toplamı | Kareler Ortalaması | F_{Hesap} |
|--------------------------------------|----|-----------------|--------------------|-------------|
| Genotip | 1 | 253,550 | 253,550 | 2,904 |
| Hata-1 | 8 | 698,585 | 87,323 | |
| Mutasyon Dozu | 7 | 961,582 | 137,369 | 4,433** |
| Genotip x Mutasyon Doz İnteraksiyonu | 7 | 2263,648 | 323,378 | 10,437** |
| Hata 2 | 49 | 1518,239 | 30,984 | |
| Genel | 72 | 5695,604 | 79,106 | |

** ortalamalar arasındaki farklılık 0,01 düzeyinde istatistik olarak önemlidir

İki farklı ekmeklik ileri hattına uygulanan kontrol dahil sekiz farklı mutasyon dozundan elde edilen genotiplerin M_1 generasyonundan alınan anterlerden gelişen kalluslardan gelişen yeşil bitkiciklerden elde edilen haploid bitki sayısı özelliği için yapılan varyans analizi sonucuna göre mutasyon dozları arasındaki farklılıklar ile genotip x mutasyon dozu interaksiyonu istatistik olarak 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Genotiplerin haploid bitki sayıları arasındaki farklılıklar ise istatistiki olarak önemli bulunmamıştır. Bu da

genotiplere uygulanan mutasyon dozlarının haploid bitki sayıları arasındaki farklılığın istatistik olarak önemli olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.1.13. Haploid bitki sayısı özelliği için genotip ortalamaları

Yapılan varyans analizi sonucunda seraya aktarılan bitki sayılarında istatistiki olarak önemli farklılık olmamasına rağmen, FA genotipinden BSB genotipine oranla daha fazla haploid bitki sayısı elde edildiği Şekil 4.1.13. dan görülmektedir.

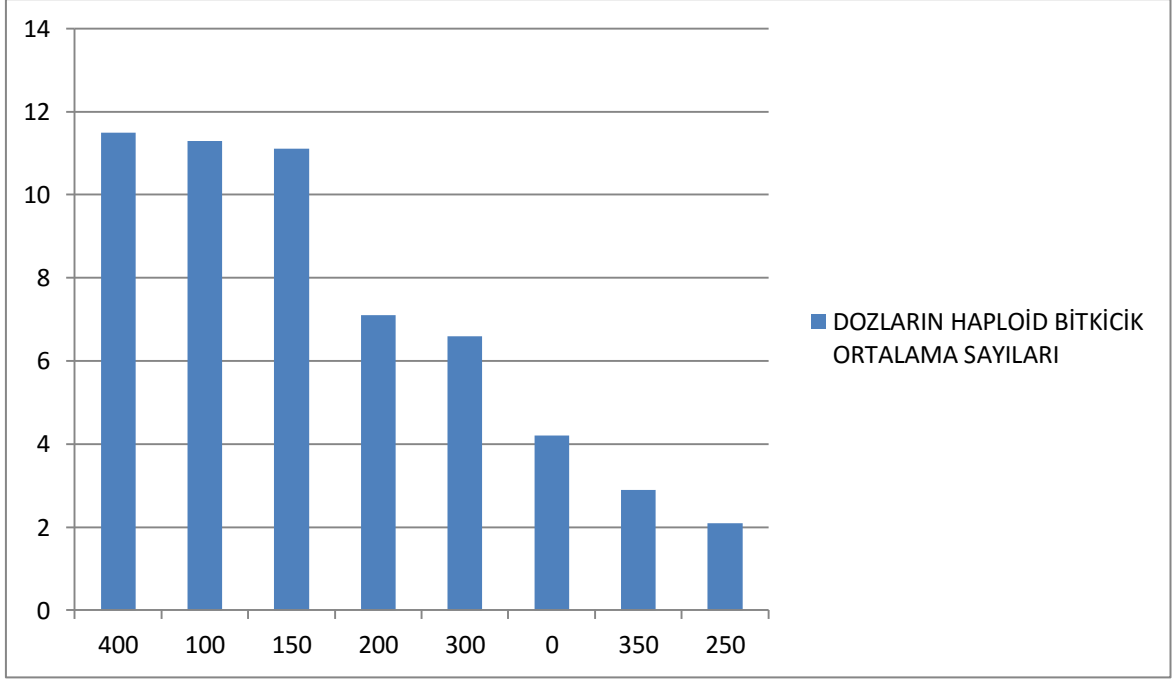
Haploid bitki sayısı özelliğine ilişkin yapılan varyans analizi tablosunda istatistiki olarak önemli bulunan mutasyon dozu, genotip x mutasyon dozu etkileşimi ortalamaları arasındaki farklılıkları ortaya koymak için Duncan önemlilik testi yapılmış ve sonuçları Çizelge 4.1.5.2. ve Çizelge 4.1.5.3. de verilmiştir.

Çizelge 4.1.5.2. Haploid bitki sayısı özelliğine ilişkin mutasyon dozu ortalamaları ve önemlilikleri

| Mutasyon Dozu | Ortalama |
|---------------|----------|
| 400 | 11,50 a |
| 100 | 11,30 a |
| 150 | 11,10 a |
| 200 | 7,10 ab |
| 300 | 6,60 ab |
| 0 | 4,20 b |
| 350 | 2,90 b |
| 250 | 2,10 b |

Haploid bitki sayısı özelliğine ilişkin mutasyon dozları üzerinde yapılan önemlilik testi sonuçları incelendiğinde, mutasyon dozlarının üç farklı istatistiki önemlilik grubu oluşturduğu görülmektedir. İki farklı ekmeclik buğday ileri hattına uygulanan farklı mutasyon dozları ile elde edilen mutant poplasyonlarından alınan anterlerden gelişen kalluslardan elde edilen ortalama haploid bitki sayıları 11,50-2,10 adet arasında değişmiştir.

Haploid bitki sayısı özelliğine ilişkin mutasyon dozları ortalamaları karşılaştırıldığında, aynı istatistik grupta yer alan 400, 100 ve 150 Gy mutasyon dozları en yüksek haploid bitki değerlerini varmışlardır. Bu mutasyon dozlarından sonra 200 ve 300 Gy ise yüksek haploid bitki sayılarını veren dozlar olmuştur. En düşük haploid bitki sayılarının elde edildiği mutasyon dozları ise aynı istatistik grupta yer almış olan 250, 350 ve 0 Gy dozları olmuştur (Şekil 4.1.14.).



Şekil 4.1.14. Haploid bitki sayısı özelliği için mutasyon dozu ortalamaları

Dozların haploid bitkicik sayıları grafikten 400 Gy dozda maksimum seviyede olduğu görülmektedir. Grafiğin en sonunda minimum haploid bitkicik 250 Gy dozda olmak ile birlikte, 0 Gy kontrol dozumuzdan sonra mutasyon dozunun değişimine göre haploid bitki sayısı artış göstermektedir.

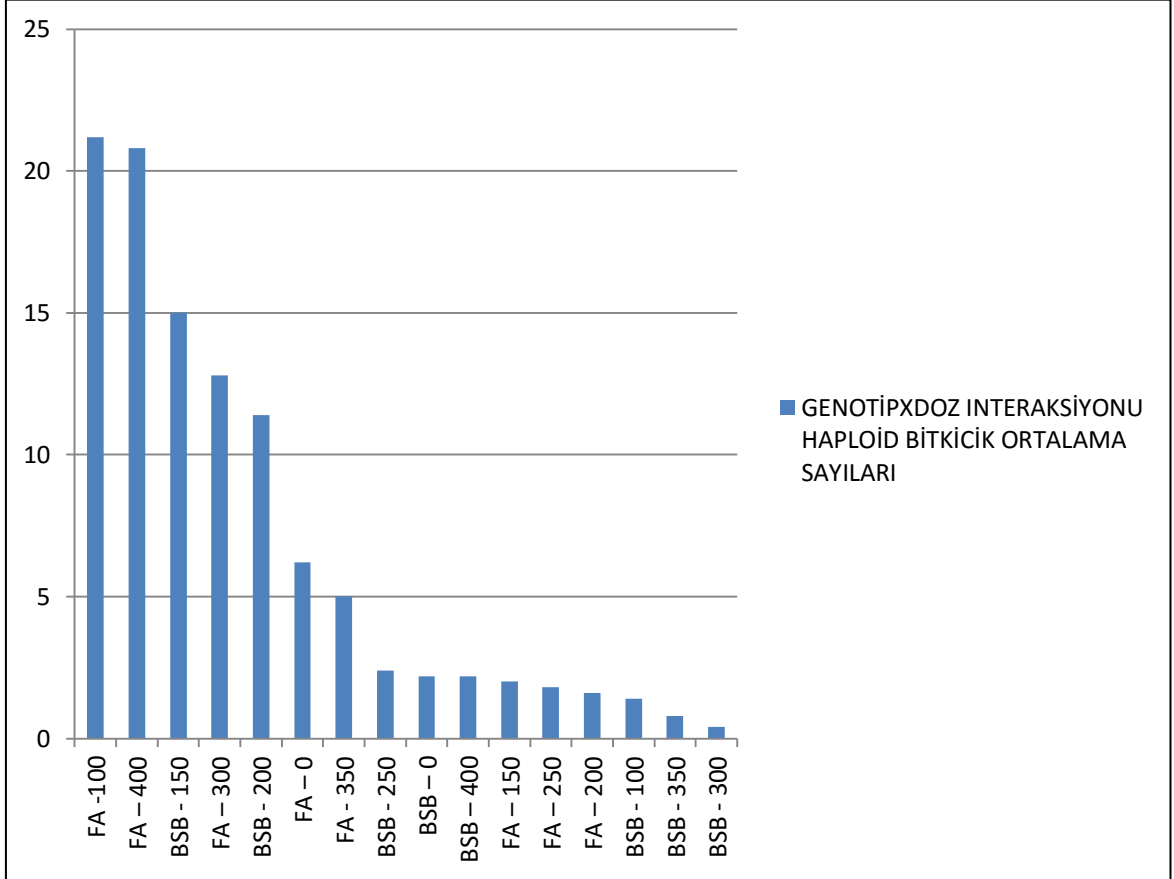
Çizelge 4.1.5.3. Haploid bitki sayısı özelliğine ilişkin genotip x mutasyon dozu ortalamaları ve önemlilikleri

| Genotip x Mutasyon Dozu | Ortalama |
|-------------------------|-----------|
| FA -100 | 21,20 a |
| FA - 400 | 20,80 a |
| BSB - 150 | 15,00 ab |
| FA - 300 | 12,80 bc |
| BSB - 200 | 11,40 bcd |
| FA - 0 | 6,20 cde |
| FA - 350 | 5,00 de |
| BSB - 250 | 2,40 e |
| BSB - 0 | 2,20 e |
| BSB - 400 | 2,20 e |
| FA - 150 | 2,00 e |
| FA - 250 | 1,80 e |
| FA - 200 | 1,60 e |
| BSB - 100 | 1,40 e |
| BSB - 350 | 0,80 e |
| BSB - 300 | 0,40 e |

Çizelgenin incelenmesinden toplamda yedi istatistiki önemlilik grubunun elde edildiği görülmektedir. İki farklı ekmeklik buğday ileri hattına uygulanan farklı mutasyon dozları ile elde edilen mutant poplasyonlarından alınan anterlerden gelişen kalluslardan elde edilen ortalama haploid bitki sayıları 21,20-0,40 arasında değişmiştir.

Haploid bitki sayısı özelliği açısından istatistiki olarak önemli bulunan genotip x mutasyon dozu interaksiyonu için yapılan çoklu karşılaştırma testi sonucunda, ortalamalar aynı istatistik grupta yer alan FA genotipinin 100 Gy ve 400 Gy dozlarından elde edilmiştir.

BSB genotipinin 150 Gy dozu 15,00 adet haploid bitki sayısı ile diğer en yüksek değere sahip kombinasyon olmuştur. En düşük yeşil bitkicik sayıları aynı istatistik grupta yer almış olan sırasıyla BSB-300 (0,40 adet), BSB-350 (0,80 adet), BSB-100 (1,40 adet), FA-200 (1,60 adet), FA-250 (1,80 adet), FA-150 (2,00 adet), BSB-400 (2,20 adet), BSB-0 (2,20 adet) ve BSB-250 (2,40 adet) kombinasyonlarından elde edilmiştir (Çizelge 4.1.5.3).



Şekil 4.1.15. Haploid bitki sayısı özelliği için genotip x doz interaksiyon ortalamaları

Genel olarak grafik incelendiğinde; BSB genotipi 300 Gy dozla en düşük seviyede haploid bitki sayısını verirken, 150 Gy dozda maksimuma ulaşmıştır. Genotip x doz interaksiyonundan BSB genotipinde kontrol dozu ile 400 Gy dozunda aynı seviye de olduğu görülmektedir. FA genotipinde de en düşük haploid bitki sayısı 200 Gy doz seviyesinde iken, en yüksek haploid bitkicik 100 Gy dozunda görülmektedir. BSB genotipinde 300 Gy den 150

Gy doza inmek, FA genotipinde de 200 Gy den 100 Gy doza inmek haploid bitki sayısını iki kat arttırmıştır.

Kalluslardan gelişen yeşil bitkiciklerden elde edilen haploid bitki sayısı özelliğine ilişkin genel bir değerlendirme yapıldığında; genotipler arasında istatistiki olarak önemli farklar belirlenemesine rağmen, genotip x doz interaksyonu ve mutasyon dozları arasındaki farklılıklar önemli bulunmuştur. Anter kültürü çalışmalarında yanıtı belirleyen en önemli faktörlerden biri genotip olmasına (Barnabas ve ark., 2001) rağmen çalışmamızda genotip etkisinin önemsiz olmasının nedeni az sayıda buğday genotipinin kullanılmış olması olabilir. Kontrol dahil uygulanan sekiz farklı mutasyon dozu ortalama haploid bitki sayıları 11,50 ile 2,10 adet arasında değişmiş, en yüksek haploid bitki sayısı ortalaması 400 Gy mutasyon dozunda belirlenmiştir. İki farklı ekmeklik buğday genotipine uygulanan kontrol dahil sekiz farklı mutasyon dozu ortalama haploid bitki sayısı 21,10 (FA-100) ile 0,40 (BSB-300) adet arasında değişmiştir. Elde ettiğimiz bu sonuçlar Khiabani ve ark. (2008) tarafından 24,13–2,00 adet olarak belirlenen haploid bitki sayısı değerleri ile benzerlikler göstermektedir.

4.1.6. Spontan doubled-haploid bitki sayısı

Tüm bitki doku kültürü uygulamalarında öncelikli amaç kallus sayısının olabildiğince yüksek elde edilmesidir. Buna karşılık yeşil bitkicik, seraya aktarılan bitki sayısının da o ölçüde yüksek olması elde edilecek haploid/doubled-haploid bitki sayısının o ölçüde fazla olmasına olanak sağlayacak olması nedeniyle çalışmanın başarısını ve etkinliğini artıracak bir özellik olarak kabul edilmektedir. Yoğun olarak buğday ıslahı programlarında uygulanan anter kültürü çalışmalarında hedeflenen haploid bitki sayısının teorik olarak yüksek olması arzu edilir. Haploid bitkiler fertil olmadığı için uygun zamanda kromozom sayısının katlanarak fertil doubled-haploid bitkilerin elde edilmesi gerekir. Kromozom katlamada en yaygın olarak kullanılan colchisin mutagen etkiye sahip olduğu için pratikte uygulanan haploid bitki sayısının az olması buna karşılık spontan doubled-haploid bitki sayısının yüksek olması tercih edilmekte ve colchisin uygulamasından kaçınılmaktadır.

Çalışmada kullanılan iki farklı ekmeklik ileri hattına uygulanan kontrol dahil sekiz farklı mutasyon dozundan elde edilen genotiplerin M₁ generasyonundan alınan anterlerden

elde edilen kalluslardan gelişen yeşil bitkiciklerden elde edilen spontan doubled-haploid bitki sayıları üzerinde varyans analizi yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.1.6.1. de verilmiştir.

Çizelge 4.1.6.1. Spontan doubled-haploid bitki sayısı özelliği için varyans analiz sonuçları

| Varyasyon Kaynağı | SD | Kareler Toplamı | Kareler Ortalaması | F _{Hesap} |
|--------------------------------------|----|-----------------|--------------------|--------------------|
| Genotip | 1 | 49.612 | 49.612 | 12.083** |
| Hata-1 | 8 | 32.847 | 4.106 | |
| Mutasyon Dozu | 7 | 112.784 | 16.112 | 7.607** |
| Genotip x Mutasyon Doz İnteraksiyonu | 7 | 127.749 | 18.250 | 8.617** |
| Hata 2 | 56 | 118.609 | 2.118 | |
| Genel | 79 | 441.602 | 5.590 | |

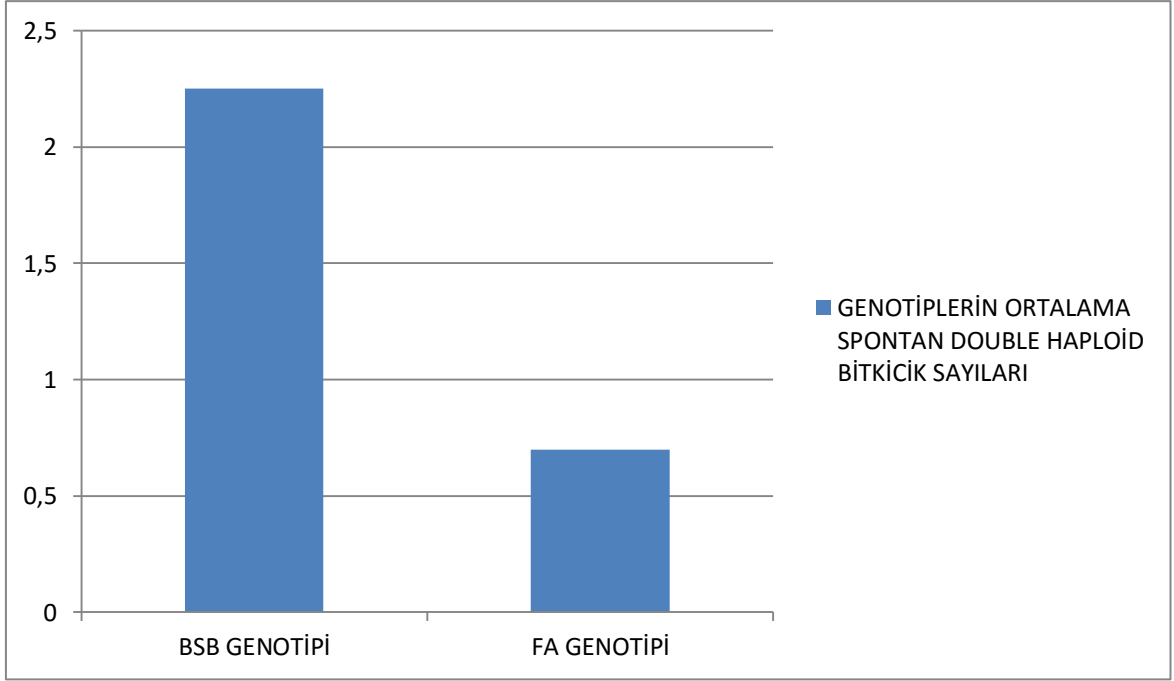
** ortalamalar arasındaki farklılık 0,01 düzeyinde istatistik olarak önemlidir

Yapılan varyans analizi sonucunda, incelenen genotipler ve mutasyon dozları ortalama spontan doubled-haploid bitki sayıları arasındaki farklılıklar ile genotip x mutasyon dozu ortalamaları arasındaki farklılıklar istatistik olarak 0.01 olasılık düzeyinde önemli bulunmuştur. İstatistik olarak önemli bulunan ortalamalar arasındaki farklılıkları ortaya koymak için Duncan önemlilik testi yapılmış ve sonuçları Çizelge 4.1.6.2., 4.1.6.3. ve 4.1.6.4. te verilmiştir.

Çizelge 4.1.6.2. Spontan doubled-haploid bitki sayısı özelliğine ilişkin genotip ortalamaları ve önemlilikleri

| Genotip | Ortalama |
|---------|----------|
| BSB | 2,25 a |
| FA | 0,70 b |

Yapılan önemlilik testi sonucunda BSB genotipi ortalama spontan doubled-haploid bitki sayısı bakımından 2,25 adet ortalama ile ilk sırada yer almış olup, FA genotipi 0,70 ortalama ile ikinci sırada yer almıştır (Çizelge 4.1.6.2.).



Şekil 4.1.16. Spontan doubled-haploid bitki sayısı özelliği için genotip ortalamaları

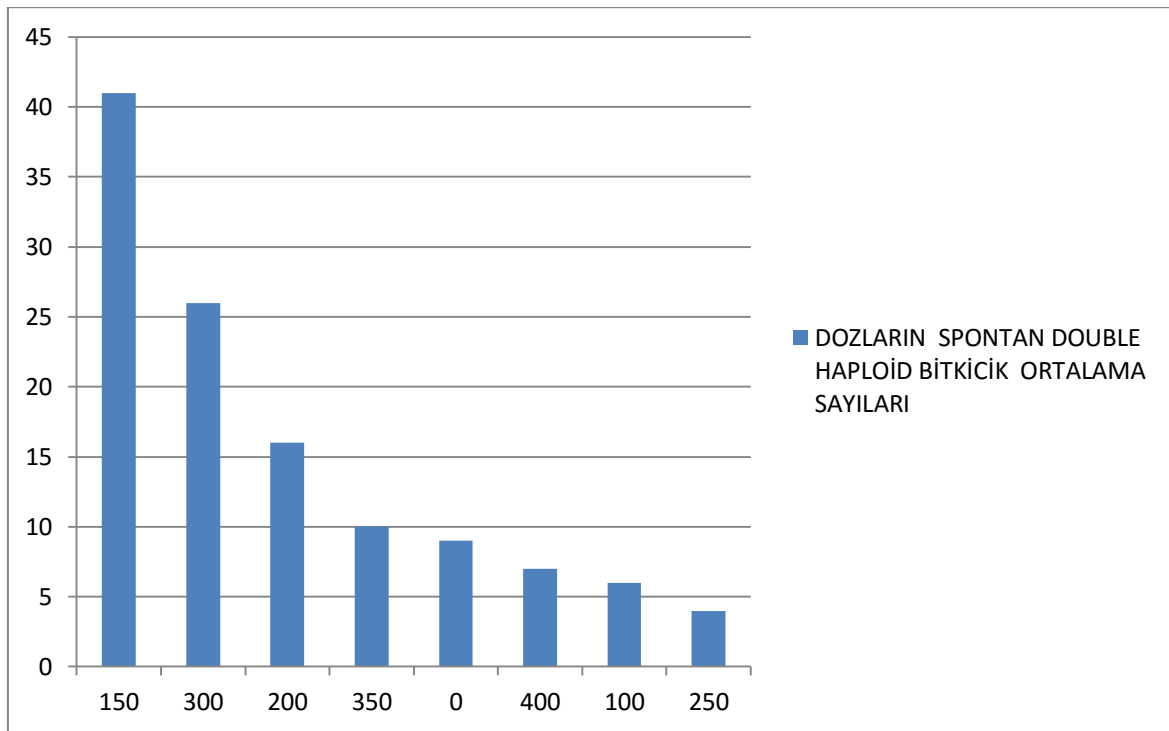
Şekil 4.1.16. den BSB genotipinin spontan doubled-haploid bitki oluşturma yeteneğinin FA genotipinden üstün olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.1.6.3. Spontan doubled-haploid bitki sayısı özelliğine ilişkin mutasyon doz ortalamaları ve önemlilikleri

| Mutasyon Dozu | Ortalama |
|---------------|----------|
| 150 | 41,00 a |
| 300 | 26,00 b |
| 200 | 16,00 c |
| 350 | 10,00 d |
| 0 | 9,00 d |
| 400 | 7,00 e |
| 100 | 6,00 e |
| 250 | 4,00 f |

Spontan doubled-haploid bitki sayısı özelliğine ilişkin mutasyon dozları üzerinde yapılan önemlilik testi sonuçları incelendiğinde, mutasyon dozlarının altı farklı istatistiki önemlilik grubu oluşturduğu görülmektedir. İki farklı ekmeklik buğday ileri hattına uygulanan farklı mutasyon dozları ile oluşan mutant poplasyonlarından alınan anterlerden gelişen kalluslardan elde edilen ortalama spontan doubled-haploid bitki sayıları 41,00-4,00 adet arasında değişmiştir (Çizelge 4.1.6.3.).

Spontan doubled-haploid bitki sayısı özelliğine ilişkin mutasyon dozları ortalamaları karşılaştırıldığında, 150 Gy mutasyon dozundan en yüksek spontan doubled-haploid bitki değeri elde edilmiştir. 300 Gy ve 200 Gy mutasyon dozları en yüksek spontan doubled-haploid bitki sayısını veren dozlar olmuştur. Bu dozlardan sonra 200 Gy mutasyon dozu sıralanmıştır. En düşük spontan doubled-haploid bitki sayılarını ise sırasıyla 250 Gy, 100 Gy, 400 Gy, 0 Gy ve 350 Gy mutasyon dozları vermiştir.



Şekil 4.1.17. Spontan doubled-haploid bitki sayısı özelliği için mutasyon dozu ortalamaları

Spontan doubled-haploid bitki sayılarının mutasyon dozlarına göre değişimi Şekil 4.1.17. den de görüleceği gibi 150 Gy dozda maksimum 250 Gy dozda minimum seviyede

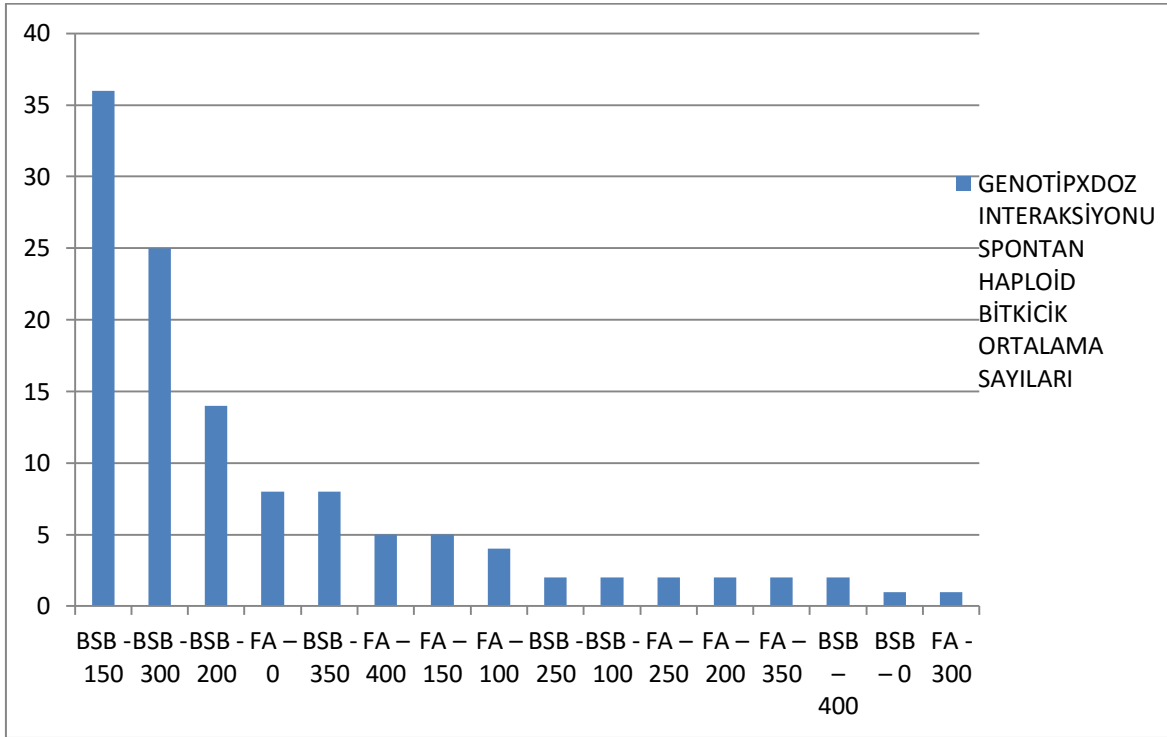
olduğu görülmektedir. Fakat, kontrol yani 0 Gy dozdan itibaren spontan doubled-haploid bitki sayısında artışlar olduğu söylenebilir.

Çizelge 4.1.6.4. Spontan doubled-haploid bitki sayısı özelliğine ilişkin genotipxdoz interaksiyonu ortalamaları ve önemlilikleri

| Genotip x Mutasyon Dozu | Ortalama |
|-------------------------|----------|
| BSB - 150 | 36,00 a |
| BSB - 300 | 25,00 b |
| BSB - 200 | 14,00 c |
| FA – 0 | 8,00 d |
| BSB - 350 | 8,00 d |
| FA – 400 | 5,00 e |
| FA – 150 | 5,00 e |
| FA – 100 | 4,00 ef |
| BSB - 250 | 2,00 fg |
| BSB - 100 | 2,00 fg |
| FA – 250 | 2,00 fg |
| FA – 200 | 2,00 fg |
| FA – 350 | 2,00 fg |
| BSB – 400 | 2,00 fg |
| BSB – 0 | 1,00 g |
| FA - 300 | 1,00 g |

Çizelge 4.1.6.4. n incelenmesinden toplamda sekiz farklı istatistiki önemlilik grubunun olduğu görülmektedir. İki farklı ekmeçlik buğday ileri hattına uygulanan farklı mutasyon dozları ile elde edilen mutant poplasyonlarından alınan anterlerden gelişen kalluslardan elde edilen ortalama spontan doubled-haploid bitki sayıları 36,00-1,00 adet arasında değişmiştir.

Spontan doubled-haploid bitki sayısı özelliği açısından istatistiki olarak önemli bulunan genotip x mutasyon dozu interaksiyonu için yapılan çoklu karşılaştırma testi sonucunda, en yüksek ortalama spontan doubled-haploid bitki sayısı BSB genotipinin 150 Gy dozunda elde edilmiştir. BSB genotipinin 300 Gy dozu (25,00 adet) ve BSB genotipinin 200 Gy dozu (14,00 adet) en yüksek spontan doubled-haploid bitki sayısının elde edildiği diğer kombinasyonlar olmuştur. Aynı istatistik grupta yer almış olan FA-300 ve BSB-0 1,00 adet ortalama spontan doubled-haploid bitki sayıları ile en düşük değerleri vermişlerdir.



Şekil 4.1.17. Spontan doubled-haploid bitki sayısı özelliği için genotip x mutasyon dozu interaksiyonu ortalamaları

Şekil 4.1.17. ün incelenmesinden de BSB genotipinin en yüksek spontan doubled-haploid bitki sayısının 150 Gy mutasyon dozundan, en düşük ise kontrol yani 0 Gy dozda elde edildiği görülmektedir.

FA genotipi ise BSB genotipinin aksine en yüksek spontan doubled-haploid bitki sayısını kontrol 0 Gy dozda, en düşük ortalama ise 300 Gy dozda vermiştir.

Kalluslardan gelişen yeşil bitkiciklerden elde edilen spontan doubled-haploid bitki sayısı özelliğine ilişkin genel bir değerlendirme yapıldığında; genotip ve mutasyon dozları arasındaki farklılıklar ile genotip x doz interaksyonu istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Çalışmamızda kullanılan ekmeklik buğday genotiplerinden BSB genotipinin ortalama spontan doubled-haploid bitki sayısı (2,25 adet) FA genotipinin ortalama spontan doubled-haploid bitki sayısına (0,70 adet) göre yaklaşık 3 kat daha fazla olmuştur. Kontrol dahil uygulanan sekiz farklı mutasyon dozu ortalama doubled-haploid bitki sayıları 41,00 ile 4,00 adet arasında değişmiş, en yüksek spontan doubled-haploid bitki sayısı ortalaması 150 Gy mutasyon dozunda belirlenmiştir. İki farklı ekmeklik buğday genotipine uygulanan kontrol dahil sekiz farklı mutasyon dozu ortalama spontan doubled-haploid bitki 36,00 (BSB-150) ile 1,00 (FA-300) adet arasında değişmiştir. Elde ettiğimiz bu değerler Holme ve ark. (1999) tarafından ortalama 3,6 adet olarak belirlenen spontan doubled-haploid bitki sayısı değerleri ile benzerlikler göstermektedir.

4.1.7. Başarı oranlarının belirlenmesi

Bu amaçla biri kılçıklı diğeri kılçıksız olmak üzere 2 farklı ileri ekmeklik buğday hattının sekiz farklı dozlardaki mutasyon uygulaması ile elde edilen M_1 generasyonundaki mutant populasyonlarının anter kültürü yanıtı üzerine etkilerinin ortaya konması amacıyla yürütülen bu araştırmada, kallus, albino bitkicik, yeşil bitkicik sayısı, seraya aktarılan bitki sayısı, haploid bitki sayısı ve doubled-haploid bitki sayıları belirlenmiş ve yukarıda ayrı ayrı açıklanmıştır. Bu bölümde başarı oranlarının yüzdelik olarak değişiminin genotip ve mutasyon dozları bazında incelenebilmesi için topluca değerlendirme yapılmıştır. Değerlendirmeler yapılırken 0 Gy yani uygulama yapılmamış kontrol doz baz olarak alınmıştır.

4.1.7.1. Genotiplerin karşılaştırılması

Genotipler bazında kallus sayısı, albino bitkicik sayısı, yeşil bitkicik sayısı, seraya aktarılan bitki ,haploid bitki sayısı ve spontan doubled-haploid bitki sayılarının genotiplerde ortalama, yüzde başarı ve değişimler Çizelge 4.1.7.1. ve Çizelge 4.1.7.2. de verilmiştir.

Genotipler arasında ortalama kallus sayıları incelendiğinde, alınan anterlerden BSB genotipi için 186.38 adet ve FA genotipi için 133.13 adet ile sırasıyla %37.28 ve %26.63 ünde kallus oluşumu gerçekleşmiştir. BSB genotipinin FA genotipine oranla %28.57 daha fazla kallus oluşturduğu Çizelge 4.1.7.1. den görülmektedir. Genotiplerin uygulanan kontrol mutasyon dozuna göre değişim oranları BSB genotipi için %49.0 ile %-16.0 ve FA genotipi için %31.3 ile %-12.2 arasında değişmiştir. En yüksek olumlu değişimin gerçekleştiği mutasyon dozları ise BSB genotipi için 150 Gy ve FA genotipi için 100 Gy dozu olmuştur. BSB-100 Gy ve FA-250 Gy kombinasyonlarında da en yüksek negatif değişim sağlanmıştır. Kontrol dozuna göre mutasyon uygulamaları ile kallus oranında genotipler için genellikle artış olduğu görülmektedir.

Doku kültüründe yüksek olması istenmeyen albino bitkicik sayısı özelliği incelendiğinde, alınan anterlerden gelişen kalluslardan BSB genotipi için 32,63 adet ve FA genotipi için 21,12 adet ile sırasıyla %17,92 ve %17,55 ünde albino bitkicik gelişmiştir. Kontrol dozuna göre mutasyon uygulamaları ile genotiplerde albino bitkicik sayılarının için genellikle azalmalara neden olduğu görülmektedir (Çizelge 4.1.7.1.). BSB genotipinin FA genotipine oranla %2,07 daha fazla albino bitkicik oluşturduğu anlaşılmaktadır. Genotiplerin uygulanan kontrol mutasyon dozuna göre değişim oranları BSB genotipi için %-10,40 ile %-36,66 ve FA genotipi için %31,3 ile %-12,2 arasında değişmiştir. En fazla negatif değişimin gerçekleştiği mutasyon dozları ise BSB genotipi için 400 Gy ve FA genotipi için 200 Gy dozu olmuştur.

Bitki doku kültüründe önemli bir sonuç olan yeşil bitkicik sayısı özelliği incelendiğinde; BSB genotipi için kontrol doza göre tüm dozların oranlarında olumlu yönde bir artış görülmesine rağmen FA genotipi için 300 ve 400 Gy dozları hariç diğer mutasyon dozlarının yeşil bitkicik oluşturmada önemli olumsuz etki yaptığı Çizelge 4.1.7.1. den anlaşılmaktadır. Alınan anterlerden gelişen kalluslardan BSB genotipi için 49,88 adet ve FA genotipi için 71,75 adet ile sırasıyla %27,11 ve %49,98 ünde yeşil bitkicik gelişmiştir. FA genotipinin BSB genotipine oranla %30,48 daha fazla yeşil bitkicik oluşturduğu anlaşılmaktadır. Genotiplerin uygulanan kontrol mutasyon dozuna göre değişim oranları BSB genotipi için %30,10 ile %9,90 ve FA genotipi için %4,74 ile

LLLLLLLL

%-34,41 arasında değişmiştir. En yüksek olumlu değişimin geręekleştięi mutasyon dozları ise BSB genotipi için 100 Gy ve FA genotipi için 400 Gy dozu olmuştur. FA-250, FA-350, FA-200, FA-150 ve FA-100 Gy kombinasyonlarında da en yüksek negatif değişim sağlanmıştır. BSB genotipinin kontrol dozuna göre mutasyon uygulamaları ile kallus oranında genotipler için genellikle artış olduğu söylenebilir.

Doku kültürlerinde elde edilen kalluslardan gelişen yeşil bitkiciklerden seraya aktarılan bitkilerin fazla olması yani aklimitizasyondan dolayı kayıpların minimum olması istenmektedir. Böylece sağlıklı köklenmiş haploid/spontan doubled-haploid bitki sayısında da artış olacaktır. Seraya aktarılan bitkicik sayısı özelliği incelendiğinde, gelişen kalluslardan elde edilen yeşil bitkiciklerden BSB genotipi için 26,50 adet ve FA genotipi için 20,63 adet ile sırasıyla %53,91 ve %31,94 ü seraya aktarılmıştır. Kontrol dozuna göre mutasyon uygulamaları ile seraya aktarılan bitki sayılarının BSB genotipinde 400 Gy mutasyon dozu hariç artışlara, FA genotipinde ise 150 Gy mutasyon dozu hariç azalmalara neden olduğu görülmektedir (Çizelge 4.1.7.2.). BSB genotipinden FA genotipine oranla %40,75 daha fazla bitki seraya aktarılmış olduğu anlaşılmaktadır. Genotiplerin uygulanan kontrol mutasyon dozuna göre değişim oranları BSB genotipi için %54,20 ile %-20,80 ve FA genotipi için %14,63 ile %-28,34 arasında değişmiştir. En fazla negatif değişimin geręekleştięi mutasyon dozları ise BSB genotipi için 400 Gy ve FA genotipi için 250 Gy dozu olmuştur.

Haploidi tekniğinde temel hedef yüksek haploid bitkilerin elde edilmesidir. Bu özellik bakımından BSB genotipi için 400 Gy FA genotipi için 150, 200 ve 350 Gy mutasyon dozları hariç kontrol doza göre tüm dozların oranlarında bir azalış olduğu, Çizelge 4.1.7.2. den anlaşılmaktadır. Gelişen kalluslardan oluşan yeşil bitkiciklerden BSB genotipi için 21,13 adet ve FA genotipi için 44,25 adet haploid bitki gelişimi belirlenmiştir. BSB genotipi için gelişen kalluslardan %40,07 inden haploid bitki gelişimi sağlanırken FA genotipinden %53,48 ünde haploid bitki gelişimi geręekleşmiştir. FA genotipinin BSB genotipine oranla %25,08 daha fazla haploid bitki oluşturduğu anlaşılmaktadır. Genotiplerin uygulanan kontrol mutasyon dozuna göre değişim oranları BSB genotipi için %7,64 ile %-55,85 ve FA genotipi için %25,31 ile %-27,42 arasında değişmiştir. En yüksek olumlu değişimin geręekleştięi mutasyon dozları ise BSB genotipi için 400 Gy ve FA genotipi için 100 Gy dozu olmuştur. BSB-300, BSB-350, BSB-100, FA-200, BSB-250, FA-150, BSB-200, BSB-150 ve FA-350 Gy kombinasyonlarında da negatif değişim sağlanmıştır.

Anter kültürü yönteminde elde edilen kalluslardan gelişen yeşil bitkiciklerden elde edilen spontan doubled-haploid bitki sayısının fazla olması kromozom katlanması için gerekli olan sürenin kısalmasına ve mutagen etkiye sahip olan colchisin'in oluşturacağı sağlık sorunlarının önüne geçilmesi nedeniyle buğday ıslahı programlarında tercih edilen bir özellik olmaktadır. Bu özellik için genotipler ve genotiplerin kontrol dozuna göre uygulanan diğer dozlar incelendiğinde, BSB genotipi için kontrol doza göre tüm dozların oranlarında olumlu yönde bir artış görülmesine rağmen FA genotipi için 150, 200 ve 250 Gy hariç diğer mutasyon dozlarının spontan doubled-haploid bitki oluşturmada önemli bir etki yapmadığı Çizelge 4.1.7.2. den anlaşılmaktadır. Seraya aktarılan yeşil bitkilerden BSB genotipi için 8,63 adet ve FA genotipi için 4.13 adet spontan doubled-haploid bitki gelişimi belirlenmiştir. BSB genotipi için gelişen kalluslardan elde edilen yeşil bitkiciklerden %13,07 inden spontan doubled-haploid bitki gelişimi elde edilirken FA genotipinden %10,13 ünde spontan doubled-haploid bitki sağlanmıştır. BSB genotipinin FA genotipine oranla %22,49 daha fazla spontan doubled-haploid bitki oluşturduğu anlaşılmaktadır. Genotiplerin uygulanan kontrol mutasyon dozuna göre değişim oranları BSB genotipi için %19,98 ile %1,59 ve FA genotipi için %6,67 ile %-10,45 arasında değişmiştir. BSB genotipinin kontrol dozuna göre mutasyon uygulamaları ile spontan doubled-haploid bitki sayılarında genellikle artış olduğu söylenebilir. En yüksek olumlu değişimin gerçekleştiği mutasyon dozları ise BSB genotipi için 150 Gy ve FA genotipi için 250 Gy dozu olmuştur. FA-100, FA-400, FA-300 ve FA-350 Gy kombinasyonlarında da en yüksek negatif değişim sağlanmıştır.

4.1.7.2. Mutasyon dozlarının karşılaştırılması

Mutasyon dozları bazında kallus sayısı, albino bitkicik sayısı, yeşil bitkicik sayısı, seraya aktarılan bitki ,haploid bitki sayısı ve spontan doubled-haploid bitki sayılarının genotiplerde mutasyon dozlarında ortalama, yüzde başarı ve değişimler Çizelge 4.1.7.3. te verilmiştir.

Kontrol dahil uygulanan mutasyon dozlarının kallus sayısı özelliği için ortalamaları incelendiğinde; alman anterlerden gelişen kallusların sayısı 221,5 (150 Gy) – 103,5 (250 Gy) adet arasında değişmiş ortalama 159,38 adet olmuştur. Anterlerden gelişen kallus sayısı özelliğine ilişkin gelişme başarısı açısından en yüksek oran (%44,30) yine 150 Gy mutasyon dozundan elde edilmiştir. 300, 100, 350 ve 400 Gy mutasyon dozları yüksek kallus başarısının elde edildiği diğer dozlar olmuştur. En düşük kallus oranı 250 Gy mutasyon dozu için

belirlenmiştir. Kontrol mutasyon dozu en düşük kallus başarısının elde edildiği diğer doz olmuştur (Çizelge 4.1.7.3.). Kontrol mutasyon dozuna göre uygulanan diğer mutasyon dozlarının değişim oranları %19,20 ile %-4,40 arasında değişmiştir. En yüksek olumlu değişimin gerçekleştiği mutasyon dozu 150 Gy ve 300 Gy olmuştur. 250 Gy mutasyon dozu dışındaki diğer dozların kontrole göre kallus sayısını teşvik ettiği söylenebilir.

Albino bitkicik sayısı özelliği için uygulanan farklı mutasyon dozu ortalamaları incelendiğinde; gelişen kalluslardan elde edilen albino bitkicik sayısı 42,0 (0 Gy) – 10,5 (250 Gy) adet arasında değişmiş ortalama 26,88 adet olmuştur. Kalluslardan gelişen albino bitkicik özelliğine ilişkin başarı oranları açısından en yüksek oran (%41,5) yine 150 Gy mutasyon dozundan elde edilmiştir. 150 ve 300 Gy mutasyon dozları yüksek albino bitkicik sayısı özelliğine ilişkin yüksek değerlerin elde edildiği diğer dozlar olmuştur. Albino bitkicik sayısının düşük olması arzu edildiği için en düşük oranların belirlendiği 250, 400, 200, 100 ve 350 Gy mutasyon dozları en uygun oranları veren dozlar olmuştur. En düşük kallus oranı 250 Gy mutasyon dozu için belirlenmiştir (Çizelge 4.1.7.3.). Kontrol mutasyon dozuna göre uygulanan diğer mutasyon dozlarının değişim oranları %-5,94 ile %-24,51 arasında değişmiştir. En yüksek negatif değişimin gerçekleştiği mutasyon dozu 400 Gy ve 250 Gy olmuştur. 350, 300, 100 Gy mutasyon dozları da albino bitkicik sayısında yüksek azalma belirlenen dozlar olmuştur. Uygulanan mutasyon dozlarının kontrole göre albino bitkicik sayısını azaltıcı etki gösterdikleri söylenebilir.

Yeşil bitkicik sayısı özelliği için uygulanan farklı mutasyon dozu ortalamaları incelendiğinde; gelişen kalluslardan elde edilen yeşil bitkicik sayısı 84,00 (150 Gy) – 18,00 (250 Gy) adet arasında değişmiş ortalama 55,59 adet olmuştur. Kalluslardan gelişen yeşil bitkicik özelliğine ilişkin başarı oranları açısından en yüksek oran (%31,01) yine 400 Gy mutasyon dozundan elde edilmiştir. 350, 250, 200, 300 ve 150 Gy mutasyon dozları yeşil bitkicik sayısı özelliğine ilişkin yüksek değerlerin elde edildiği diğer dozlar olmuştur. Yeşil bitkicik sayısının yüksek olması arzu edildiği için bu mutasyon dozları en uygun oranları veren dozlar olmuştur. En düşük yeşil bitkicik oranı 0 ve 100 Gy mutasyon dozları için belirlenmiştir (Çizelge 4.1.7.3.). Kontrol mutasyon dozuna göre uygulanan diğer mutasyon dozlarının değişim oranları 12,00 ile %-2,31 arasında değişmiştir. En yüksek artışın gerçekleştiği mutasyon dozları 400, 350 ve 250 Gy olmuştur. 200, 300, 150 Gy mutasyon dozları da yeşil bitkicik sayısında artışların belirlendiği diğer dozlar olmuştur. Uygulanan

mutasyon dozlarının kontrole göre yeşil bitkicik sayısını artırıcı etkiye sahip oldukları söylenebilir.

Seraya aktarılan yeşil bitki sayısı özelliği için uygulanan farklı mutasyon dozu ortalamaları incelendiğinde; gelişen yeşil bitkiciklerden elde edilen seraya aktarılan yeşil bitki sayısı 41,50 (150 Gy) – 8,50 (250 Gy) adet arasında değişmiş ortalama 23,56 adet olmuştur. Yeşil bitkiciklerden seraya aktarılan yeşil bitki özelliğine ilişkin başarı oranları açısından en yüksek oran (%53,68) yine 350 Gy mutasyon dozundan elde edilmiştir. 150, 250, 0 ve 300 Gy mutasyon dozları yüksek seraya aktarılan yeşil bitkicik sayısı özelliğine ilişkin yüksek değerlerin elde edildiği diğer dozlar olmuştur. Seraya aktarılan yeşil bitki sayısının yüksek olması arzu edildiği için bu mutasyon dozları en uygun oranları veren dozlar olmuştur. En düşük seraya aktarılan yeşil bitki oranları 400, 100 ve 200 Gy mutasyon dozları için belirlenmiştir (Çizelge 4.1.7.3.). Kontrol mutasyon dozuna göre uygulanan diğer mutasyon dozlarının değişim oranları %8,81 ile %-21,49 arasında değişmiştir. En yüksek artışın gerçekleştiği mutasyon dozları 350, 150 ve 250 Gy olmuştur. 400, 100, 200 ve 300 Gy mutasyon dozları da seraya aktarılan bitkicik sayısında yüksek oranda azalmalara neden olmuştur. Uygulanan mutasyon dozlarının kontrole göre seraya aktarılan yeşil bitki sayısını azaltıcı etkiye sahip oldukları söylenebilir.

Kontrol dahil uygulanan farklı mutasyon dozlarının haploid bitki sayısı özelliği için ortalamaları incelendiğinde; gelişen yeşil bitkiciklerden elde edilen haploid bitki sayıları 57,50 (400 Gy) – 9,00 (250 Gy) adet arasında değişmiş ortalama 65,38 adet olmuştur. Kalluslardan gelişen yeşil bitkiciklerden elde edilen haploid bitki sayısı özelliğine ilişkin en yüksek başarısı oranı (%74,68) yine 400 Gy mutasyon dozundan elde edilmiştir. 100, 0, 150 ve 250 Gy mutasyon dozları haploid bitki sayısı özelliği için yüksek başarımın elde edildiği diğer dozlar olmuştur. En düşük oranları 350, 300 ve 200 Gy mutasyon dozları için belirlenmiştir (Çizelge 4.1.7.3.). Kontrol mutasyon dozuna göre uygulanan diğer mutasyon dozlarının değişim oranları %20,83 ile %-23,32 arasında değişmiştir. En yüksek olumlu değişimin gerçekleştiği mutasyon dozu 400 Gy ve 100 Gy olmuştur. Bu mutasyon dozları dışındaki diğer mutasyon dozlarının kontrole göre haploid bitki sayısını azaltıcı yönde etkilediği söylenebilir.

Spontan doubled-haploid bitki sayısı özelliği için uygulanan kontrol dahil farklı mutasyon dozu ortalamaları incelendiğinde; gelişen yeşil bitkiciklerden elde edilen spontan

doubled-haploid bitki sayısı 20,50 (150 Gy) – 2,00 (250 Gy) adet arasında değişmiş ortalama 7,00 adet olmuştur. Yeşil bitkiciklerden elde edilen spontan doubled-haploid bitki sayısı özelliğine ilişkin başarı oranları açısından en yüksek oran (%24,41) yine 150 Gy mutasyon dozundan elde edilmiştir. 200, 0 ve 250 Gy mutasyon dozları yüksek spontan doubled-haploid bitki sayısı özelliğine ilişkin yüksek değerlerin elde edildiği diğer dozlar olmuştur.

GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG

En düşük spontan doubled-haploid oranları 100, 400, 300 ve 350 Gy mutasyon dozları için belirlenmiştir (Çizelge 4.1.7.3.). Kontrol mutasyon dozuna göre uygulanan diğer mutasyon dozlarının değişim oranları %12,87 ile %-7,95 arasında değişmiştir. En yüksek artışın gerçekleştiği mutasyon dozları 150 ve 200 Gy olmuştur. Bunlar dışındaki 100, 400, 300, 350 ve 250 Gy mutasyon dozları da spontan doubled-haploid bitki sayısında azalmalara neden olmuştur. Uygulanan mutasyon dozlarının kontrole göre spontan doubled-haploid bitki sayısını çok önemli olmasa da azaltıcı etkiye sahip oldukları söylenebilir.

Besi ortamına aktarılan anterlerden gelişen kallus sayısı özelliği için elde edilen sonuçların genel değerlendirilmesi sonucunda, genotipler için kallus sayısı ortalaması 159,76 ve başarı oranı %31,96 olduğu, BSB genotipinin FA genotipine göre %28,57 daha fazla kallus sayısına sahip olduğu, kallus oluşturmada BSB genotipinin FA genotipine göre %10,65 daha başarılı olduğu söylenebilir. Kontrol dozu ile karşılaştırıldığında BSB genotipi için 100 ve 400 Gy, FA genotipi için 150, 250 ve 200 Gy mutasyon dozları dışındaki dozların kallus sayısını arttırıcı etkiye sahip olmuştur. Mutasyon dozlarının kallus sayısı özelliği üzerine etkileri incelendiğinde; dozların kallus sayısının 221,50 adet (150 Gy) ile 103,50 adet (250 Gy) arasında değiştiği ortalama 159,38 adet olduğu, kallus sayısı oluşturmada 150 Gy mutasyon dozunun %44,30 ile en yüksek başarıya sahip doz olduğu ve kontrol dozuna göre 250 Gy mutasyon dozu hariç diğer dozların kallus sayısını arttırıcı etkiye sahip olduğu anlaşılmaktadır. Çalışmamızda elde ettiğimiz %31,95 lik kallus oranı, Ghaffari ve ark. (2004) nın 200 Gy mutasyon dozunda belirlediği en yüksek kallus elde edilme oranı olan %12,5 ve Sesek (1994) belirlediği %13,3 ortalama kallus sayısından daha yüksek bulunmuştur. Bu farklılığın sebebi kullanılan çeşitlerin ve yetiştirme ortamının farklılığı olabilir. Aynı zamanda elde edilen bu sonuçlar Khiabani ve ark. (2008) in elde ettiği ortalama %28,42 değer ile desteklenmektedir.

Besi ortamına aktarılan anterlerden gelişen albino bitkicik sayısı özelliği için elde edilen sonuçların topluca değerlendirilmesinden, genotipler için albino bitkicik sayısı ortalaması 26,88 ve başarı oranı %17,74 olduğu anlaşılmaktadır. BSB ve FA genotipi birbirine yakın ortalama albino bitkicik sayılarına sahip olmuştur. Buğday ıslah programlarında anter kültürü uygulamalarında kalluslardan gelişen albino bitkicik sayısı oldukça yüksek olmakta ve dolayısıyla başarıyı sınırlandıran en önemli faktörlerden biri konumundadır (Cistue ve ark., 2006). Bu yüzden albino bitkicik sayısının olabildiğince düşük olması istendiği için FA genotipinin BSB genotipine göre %0,37 daha başarılı olduğu

söylenbilir. Kontrol dozu ile karşılaştırıldığında genellikle mutasyon dozlarının her iki genotipte de albino bitkicik sayısını azaltıcı etkiye sahip olduğu bu azalmanın BSB genotipi için FA genotipine göre %42,62 daha fazla olduğu görülmektedir. Mutasyon dozlarının albino bitkicik özelliği üzerine etkileri incelendiğinde; dozların albino bitkicik sayılarının 42 adet (0 Gy) ile 10,50 adet (250 Gy) arasında değiştiği ortalama 26,88 adet olduğu, albino bitkicik oluşturmada 400 Gy mutasyon dozunun %8,13 ile en yüksek başarıya sahip doz olduğu ve kontrol dozuna göre tüm mutasyon dozlarının albino bitkicik sayısını azaltıcı etkiye sahip olduğu söylenebilir. Elde ettiğimiz %22,31 lik ortalama albino bitkicik sayısı değerleri Armstrong ve ark. (1992) %47,3 lük albino bitkicik sayısının altında, El-Hennawy ve ark. (2011) açıkladığı ortalama %12,00 lük albino bitkicik sayısının üzerinde yer almıştır. Bu farklılığın nedeni araştırmacıdan farklı olarak mutasyon uygulamasının yapılmış olması ve kullanılan genotiplerin farklılığından kaynaklanmış olabilir. Bunun ile birlikte sonuçlarımız kontrol dozuna göre mutasyon uygulanmış dozlardan elde edilen albino bitkicik sayısında oldukça fazla azalma olduğunu açıklayan Lu ve ark. (1999) nın sonuçları ile uyum içindedir.

Besi ortamına aktarılan anterlerden gelişen yeşil bitkicik sayısı özelliği için elde edilen sonuçların topluca değerlendirilmesinden, genotipler için yeşil bitkicik sayısı ortalaması 60,82 ve başarı oranı %38,55 olduğu görülmektedir. FA genotipi için elde edilen ortalama yeşil bitkicik sayısı 71,75 adet ile BSB genotipi için elde edilen ortalama 49,88 adet yeşil bitkicik sayısına göre %30,48 daha fazla gerçekleşmiştir. Yeşil bitkicik sayısının bitki doku kültürlerinde olabildiğince yüksek olması arzu edilmesi nedeniyle FA genotipi BSB genotipine göre %22,87 oranında daha yüksek başarıya sahip olmuştur. Kontrol dozu ile karşılaştırıldığında genellikle mutasyon dozlarının BSB genotipi için yeşil bitkicik sayısını arttırıcı etkiye, FA genotipinde ise azaltıcı etkiye sahip olduğu anlaşılmaktadır. Mutasyon dozlarının yeşil bitkicik özelliği üzerine etkileri incelendiğinde; dozların yeşil bitkicik ortalama sayılarının 84 adet (150 Gy) ile 18 adet (250 Gy) arasında değiştiği ve ortalama 55,59 adet olduğu, yeşil bitkicik oluşturmada 400 Gy mutasyon dozunun %31,01 ile en yüksek başarıya sahip doz olduğu ve kontrol dozuna göre 100 Gy hariç diğer tüm mutasyon dozlarının yeşil bitkicik sayısını arttırıcı etkiye sahip olduğu görülmektedir. Bu verilerin ışığında elde ettiğimiz %31,36 lük yeşil bitkicik oranı, Molina ve Aldana (2001) nın belirlediği %27,40 lük oran ve Lashermes ve ark. (1991) nın belirlediği %25,00 yeşil bitkicik oranları ile desteklenmektedir.

Besi ortamına aktarılan anterlerden gelişen kalluslardan elde edilen yeşil bitkiciklerden seraya aktarılan bitki sayısı özelliği için elde edilen sonuçların topluca değerlendirilmesinden, genotipler için yeşil bitkicik sayısı ortalaması 23,57 ve başarı oranı %42,97 olduğu görülmektedir. BSB genotipinden FA genotipine göre %22,15 daha fazla bitki seraya aktarılmıştır. Seraya aktarılan bitki sayısının olabildiğince yüksek olması istendiği için BSB genotipi FA genotipine göre %40,59 daha başarılı olmuştur. Kontrol dozu ile karşılaştırıldığında genellikle mutasyon dozlarının BSB genotipinde seraya aktarılan bitki sayısını arttırıcı, FA genotipinde ise azaltıcı etkiye sahip olmuştur. Mutasyon dozlarının seraya aktarılan bitki özelliği üzerine etkileri incelendiğinde; dozların seraya aktarılan bitki sayılarının 41.50 adet (150 Gy) ile 8,50 adet (250 Gy) arasında değiştiği ortalama 23,56 adet olduğu, seraya aktarılan bitki oluşturmada 350 Gy mutasyon dozunun %53,68 ile en yüksek başarıya sahip doz olduğu ve kontrol dozuna göre 350, 150 ve 250 mutasyon dozlarının seraya aktarılan bitki sayısını arttırıcı etkiye sahip olduğu söylenebilir. Çalışma sonunda kalluslardan gelişen yeşil bitkiciklerden %42,97 si seraya aktarılmıştır.

Besi ortamına aktarılan anterlerden gelişen kalluslardan oluşan yeşil bitki sayısından, elde edilen haploid bitki sayısı özelliği için elde edilen verilere göre, genotipler için haploid bitki sayısı ortalaması 32,69 ve başarı oranı %46,78 olarak belirlenmiştir. FA genotipi 45,25 adet ile BSB genotipinin 21,13 adet ortalama haploid bitki sayılarına göre %52,25 oranında daha fazla haploid bitkiye sahip olmuştur. Haploid bitki sayısının olabildiğince yüksek olması istendiği için FA genotipinin BSB genotipine göre %13,41 daha başarılı sonuçlar verdiği anlaşılmıştır. Kontrol dozu ile karşılaştırıldığında genellikle mutasyon dozlarının BSB genotipinde haploid bitki sayısını azaltıcı, FA genotipinde arttırıcı etkiye sahip olduğu görülmektedir. Mutasyon dozlarının haploid bitki özelliği üzerine etkileri incelendiğinde; dozların haploid bitki sayılarının 57,50 adet (400 Gy) ile 9,25 adet (250 Gy) arasında değiştiği ortalama 32,69 adet olduğu, haploid bitki oluşturmada 400 Gy mutasyon dozunun %74,68 ile en yüksek başarıya sahip doz olduğu ve kontrol dozuna göre 100 ve 400 Gy dışındaki tüm mutasyon dozlarının haploid bitki sayısını azaltıcı etkiye sahip olduğu söylenebilir. Çalışmamızda elde ettiğimiz ortalama haploid bitki sayısı olan %49,35, Chen ve ark. (2001) nin belirlediği %70 değerinin altında, Tiwari ve Rahimbaves (1992) nin belirttiği %15-20 değerinin üzerinde ve Armstrong ve ark. (1987) nin %47,9 luk haploid bitki sayısı ile benzerlik göstermektedir.

Besi ortamına aktarılan anterlerden gelişen kalluslardan elde edilen yeşil bitkiciklerden seraya aktarılan bitkilerden elde edilen spontan doubled-haploid bitki sayısı özelliği için elde edilen sonuçlara göre, genotipler için spontan doubled-haploid sayısı ortalaması 6,38 ve başarı oranı %11,60 olarak belirlenmiştir. BSB genotipi 8,63 adet ortalama ile FA genotipinin 4,13 adet ortalamasına göre % 52,14 oranında daha fazla spontan doubled-haploid bitki sayısına sahip olmuştur. Spontan doubled-haploid bitki sayısının olabildiğince yüksek olması istendiği için BSB genotipinin FA genotipine göre %2,37 daha başarılı olduğu söylenebilir. Kontrol dozu ile karşılaştırıldığında genellikle mutasyon dozlarının BSB genotipi için spontan doubled-haploid bitki sayısını arttırıcı etkiye, FA genotipi için ise 150, 200 ve 250 Gy dışında azaltıcı etkiye sahip olduğu bu azalmanın BSB genotipi için FA genotipine göre %11,18 daha fazla olduğu anlaşılmaktadır. Mutasyon dozlarının spontan doubled-haploid bitki özelliği üzerine etkileri incelendiğinde; dozların spontan doubled-haploid bitki 20,50 adet (150 Gy) ile 2,00 adet (250 Gy) arasında değiştiği ortalama 7,00 adet olduğu, spontan doubled-haploid bitki oluşturmada 150 Gy mutasyon dozunun %24,41 ile en yüksek başarıya sahip doz olduğu ve kontrol dozuna göre 150 ve 200 Gy dışında tüm mutasyon dozlarının spontan doubled-haploid bitki sayısını azaltıcı etkiye sahip olduğu anlaşılmaktadır. Araştırmamız sonucunda elde ettiğimiz ortalama %11,55 spontan doubled-haploid oranı Lantos ve ark. (2013b) açıkladığı %35,00 ve Chen ve ark. (2001) in çalışmalarında elde ettiği %19,30 değerlerinden farklılık göstermesine rağmen Khaiabani ve ark. (2008) nin açıkladığı %13,07 ile benzerlik göstermektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER.

Araştırmada incelenen tüm anter kültürü özellikleri için kullanılan genotipler (BSB ve FA) istatistiksel olarak önemli etkide bulunmamışlardır. Bunun nedeni yeterince farklı özelliklere sahip ekmeklik buğday genotiplerinin kullanılması olabilir. Benzer çalışmalarda anter kültürüne reaksiyonları bilinen daha fazla sayıda ekmeklik buğday genotipinin kullanılmasıyla buğday ıslah programlarında anter kültüründen daha etkin yararlanmanın mümkün olabileceğini göstermektedir.

Araştırmada incelenen tüm anter kültürü özellikleri için kullanılan genotiplere uygulanan gamma ışını dozları ve genotip x mutasyon dozu interaksyonları etkileri istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Mutasyon dozu etkilerinin kullanılan genotiplere göre etkilerinde değişiklik olmakla birlikte genel olarak 150 Gy dozu kallus gelişimi ve spontan doubled-haploid bitki sayısını artırıcı ve albino bitkicik sayısını azaltıcı etkiye sahip olduğu, 100 Gy dozu yeşil bitkicik ve haploid bitki sayısını artırıcı etkiye sahip olması nedeniyle mutasyon ıslahı çalışmalarında anter kültüründen daha etkin yararlanabilmek için düşük doz uygulamaları yapılmasının daha doğru olabileceği kanısına varılmıştır.

Araştırmada, elde edilen spontan doubled-haploid bitkiler 2015-16 yetiştirme yılında tarla koşullarında yetiştirilmiş, bitkisel özellikleri ve agronomik skorlama sonucunda ümitvar olabileceğine karar verilen yaklaşık 100 spontan doubled-haploid hat seçilerek mikro verim denemelerine alınacaktır.

Buradan da gamma ışını uygulaması ile anter kültürüne yanıtın artırılabilceği, bitki ıslahı programlarında mutasyon ıslahı ile anter kültürü tekniğinin kombine edilebileceği ve bu şekilde ıslah programının süresinin daha da kısaltılarak etkinliğinin artırılmasının mümkün olacağı sonucuna varılmıştır.

6. KAYNAKLAR

- Abdel-Hady, MS and Ali, ZA (2006). Effect of gamma irradiation on wheat immature culture regenerated plants. *Journal of Applied Science Research*, 2 (6), 310- 316.
- Ahluwalia J, Urban L, Capogna M, Bevan S and Nagy I (2000). Cannabinoid 1 receptors are expressed in nociceptive primary sensory neurons. *Neuroscience*100: 685–688.
- Ahloowalia B, Fray SC (1986). Barley endosperm cell walls contain a feruloylated arabinoxylan and a non-feruloylated b-glucan. *J. Cereal Sci.*, 4: 287–295.
- Ahloowalia BS (1998). *In vitro* techniques and mutagenesis for the improvement of vegetatively propagated plants. In *Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement*, edited by Jain, SM, Brar DS & Ahloowalia, BS Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publisher. pp. 293-309.
- Al-Safadi B, Ayyoubi Z and Jawdat D, (2000). The effect of gamma irradiation on potato micro-tuber production in vitro. *Plant Cell Tiss.Organ.Cult.* 61, 183-187.
- Arabi MIE, Al-Safadi B, Jawhar M, and N Mir-Ali (2005).Enhancement of embryogenesis and plant regeneration from barley anther culture by low doses of gamma irradiation. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 41, 762-764.
- Armstrong CL, Romeno-Severson J, Hodges TK (1992). Improved tissue culture response of an elite maize inbreed through backcross breeding, and identification chromosomal regions important regeneration by RFLP analysis. *TAG Theoretical and Applied Genetics.* 84:755-762, USA.
- Ashri A (1993). Mutation breeding in oil crops. In: M. Maluszynski and A. Ashri [Eds]. Report of the First FAO/IAEA Seminar on the use of Induced Mutagenesis and related Biotechnology for Crop Improvement for the Middle East and the Mediterranean region. IAEA, Vienna, pp. 82-94.
- Bajaj YPS (1983). *In vitro* production of haploids I. Springer-Verlag Berlin. 549 p.
- Bakos F, Darkó E, Ascough G, Gáspár L, Ambrus H, and Barnabás B (2008). A cytological study on aluminium-treated wheat anther cultures resulting in plants with increased Al tolerance. *Plant Breed.* 127, 235-240.

- Barnabas B, Szakacs E, Karsai I, and Bedö Z (2000). *In vitro* androgenesis of wheat from Fundamentals to practical application. Eds.: Bedo Z and Lang L. Wheat in a Global Environment, Kluwer Acad.Publishers, Dordrecht, 517-525.
- Barnabas B, Szakacs E, Karsai I, and Bedö Z (2001). Protocol for producing doubled haploid plants from anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.). Doubled Haploid Production in Crop Plants, 65-70.
- Belchev I, and Kostov K (2003). Changes in androgenic response of wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties after spike treatment with gamma rays. Bulg. J. Agric. Sci. 9, 29-32.
- Bourgin JP, Nitsch JP (1967) .Obtention de Nicotiana haploides a partir d'etamines cultivees in vitro. Ann. Pysiol. Veget., 9:377-382.
- Cheng SH, Gregory RJ, Marshall J, Paul S, Souza DW, White GA, O'Riordan CR, Smith AE (1990). Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis Cell. Nov 16;63(4):827-34.
- Chen QF, Wang, CL, Lu YM, Shen M, Afza R, Duren MV and Brunner H (2001). Anther culture in connection with induced mutations for rice improvement. Euphytica 120: 401-408.
- Cistué L, Soriano M, Castillo AM, Valles MP, Sanz JM and Echavarri B (2006). Production of doubled haploids in durum wheat (*Triticum turgidum* L.) through isolated microspore culture. *Plant Cell Rep* 25:257–264.
- Clapham (1973). Haploid *Hordeum* plants from anthers *in vitro*.- 2. *Pflanzenzucht*. 69: 142-155.
- Çay F (2012). Bazı Buğday Melez Populasyonlarının Anter Kültürüne Yanıtları. Yayınlanmamış yüksek lisans tezi, Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 64s.
- De Buyser, J, Henry Y, Lonnet P, Hertzog R and Hespel A (1987). “lorin” a doubled haploid wheat variety development by anther culture method. *Plant Breed*. 98 : 53-56.
- Din R, Qasim M, Ahmad K (2004). Radio Sensitivity of Various Wheat Genotypes in M₁ Generation. *International Journal of Agriculture & Biology* 1560–8530/06–5–898–900.

- Ding, XL, Luckett, DJ, and Darvey NL (1991). Low dose gamma irradiation promotes wheat anther culture response. *Austr. J. Bot.* 39, 467-474.
- Düzgüneş O, Kesici T, Kavuncu O ve Gürbüz F (1987). Araştırma ve Deneme Metodları. Ank. Üniv. Ziraat Fak. Yay.1021. Ders Kitabı:295. 381s.
- El-Hennawy MA, Abdalla AF, Shafey SA and Al-Ashkar IM (2011). Production of doubled haploid wheat lines (*Triticum aestivum* L.) using anther culture technique. *Annals of Agricultural Science* 56(2), 63–72.
- Foster PL, Trimarchi JM, Maurer RA (1996). Two enzymes, both of which process recombination intermediates, have opposite effects on adaptive mutation in *Escherichia coli*. *Genetics*.142:25–37.
- Forster BP (2001). Mutation genetics of salt tolerance in barley: an assessment of Golden Promise and other semi-dwarf mutants. *Euphytica* 120:317–328 Forster BP, Thomas WTB (2005) Doubled haploids in genetics and plant breeding. *Plant Breed Rev* 25:57–88.
- Gavazzi G, Tonelli C, Todesco G, Arreghini E, Raffaldi F, Vecchio, F., Barbuzz G, Biasini MG, F (1987). Somaclonal variation versus chemically induced mutagenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) *Theoretical and Applied Genetics* Volume 74, Issue 6, pp 733-738.
- Genovesi AD and Collins GB (1982). In vitro production of haploid plant of corn via anther culture. *Crop Sci.* 22:1137-1144.
- Ghaffari M, Nejati-Javaremi A and Rahimi G (2009). Detection of polymorphism in BMPR-IB gene associated with twining in Shal sheep using PCR-RFLP method. *Int. J. Agric. Biol.* 11, 97-99.
- Ghaffari M, Naserian B ,Majd F, Rahimi M and Booshehri A (2004). Evaluation of anther culture response in descents of Gamma radiated wheats. *Proceedings of The Fourth International Iran & Russia Conference*, p. 105-107.
- Guha S and Maheshwari SC (1964). In vitro production of embryos from anthers of *Datura*, *Nature (Lond)* 204:497.
- Hatipoglu R, Genç İ ve Yağabasanlar T (1994). Ekmeklik Bugday (*Triticum aestivum* L.) Islahında Anter Kültüründe Yararlanma Olanakları Üzerinde Araştırmalar. *Tarla Bitkileri Kongresi Cilt II Bitki Islahı Bildirileri* s: 254–256, Bornova /İzmir.

- Holme IB, Olesen A, Hansen NJP and Andersen SB (1999). Anther and isolated microspore culture response of wheat lines from northwestern and eastern Europe. *Plant Breeding*, 118:111-117.
- Hu D, Tang Y, Yuan Z and Wang J (1983). The induction of pollen sporophyte of winter wheat and development of new variety Jinghua no 1. *Science Agricultural Sinica*, 1:29-35.
- Hu Y, Bao RR and Xue XY (1988). The new strain '764' of spring wheat by pollen haploid technique from anther culture. *Genetic Manipulation in Crops Newsletter*, 4:70-85.
- Hu DZ, Yuan Y, Tang and Liu J (1986). Jinhua No. 1. A winter wheat variety derived by pollen sporophyte. *Scientia Sinica series. B, XXIX* : 733-745.
- Human, S., Shono, S., P. Parno, (2012). Application of Mutation Techniques in Sorghum Breeding For Improved Drought Tolerance. *Atom Indonesia* 32 (1) 35-43.
- Humphreys MW, Gasior D, Lesniewska-Bocianowska A, Zwierzykowski Z, and Rapacz M (2007). Androgenesis as a means of dissecting complex genetic and physiological controls: selecting useful gene combinations for breeding freezing tolerant grasses. *Euphytica* 158, 337-345.
- Irfaq M, Nawab K (2003). A Study to Determine the Proper Dose of Gamma Radiation for Inducing Beneficial Genetic Variability in Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Asian Journal of Plant Sciences* 2 (13): 999-1003.
- Jäger KV, Ördög and Barnabás B (2005). Effect of cyanobacterial and microalgal biomass on anther culture response of wheat (*Triticum aestivum* L.) *Acta Agronomica Hungarica* 53 (1).
- Jauhar PP, Xu SS, and Baenziger PS (2009). Haploidy in cultivated wheats: induction and utility in basic and applied research. *Crop Sci.* 49, 737-755.
- Jende-Strid B (1993). Genetic control of flavonoid biosynthesis in barley. *Hereditas.* 119:187-204.
- Jensen CJ (1974). In: *Haploids in Higher Plants* pp. 153-190.
- Johansen DA (1934). Haploids in *Hordeum vulgare*. - *Proc. Nat. Ac. Sci.* 20: 98-100.

- Kainthura P and Srivastava R (2015). Induction of Genetic Variability and Isolation of Mutants in Tuberose (*Polianthes tuberosa* L). *Tropical Agricultural Research* Vol. 26 (4): 721 – 732.
- Kasha KJ (1989). Production of haploids in cereals. p. 71–80. In M. Maluszynski (ed.) *Current options for cereal improvement*. Kluwer Academic Publishers, London.
- Kasha KJ and Reinbergs E (1975). Haploidy and Polyploidy and its application in Breeding Techniques. In: *Barley Genetics III*, Gustav, A., Wiebe (Editor), p: 307-315, München, Republic of Germany.
- Kasha KJ (2005). Chromosome Doubling and Recovery of Doubled Haploid Plants. In: Palmer CE, Keller WA, Kasha KJ (eds) *Haploids in crop improvement II*, vol 56. Springer, Heidelberg, pp 123–152.
- Khan AS and Malik MA (1999). Effect of Gamma Irradiation on Some Morphological Characters of Three Wheat Varieties. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2 (3):903-905.
- Khan AJ, Hassan S, Tariq M and Khan T (2001). Haploid breeding and mutagenesis for drought tolerance in wheat. *Euphytica* 120, 409-414.
- Khiabani BN, Vedadi C, Rahmani E and Shalmani MAM (2008). Response of some Iranian wheat genotypes to anther culture system. *Indian J. Biotechnol.* 7, 531-535.
- Konieczny R, Czaplicki AZ, Golczyk H and Przywara L (2003). Two pathways of plant regeneration in wheat anther culture. *Plant Cell Tiss. Org .Cult.*, 73, 177-187.
- Korkut KZ, Başer I, Turhan H, Bilgin O, (2001). Yerli ve yabancı kökenli ekmeklik buğday çeşit ve hatlarında haploid ve dihaploid genotiplerin elde edilme olanakları. TÜAF-232. Tekirdağ.
- Kristiansen K, Andersen SB, (1993). Effects of donor plant temperature, photoperiod, and age on anther culture response of *Capsicum annuum* L. *Euphytica* 67: 105-109.
- Kuşaksız T, Dere Ş (2010). A Study on The Determination of Genotypic Variation For Seed Yield And Its Utilization Through Selection in Durum Wheat (*Triticum durum* Desf.) Mutant Populations. *Turkish Journal of Field Crops* 15(2): 188-192.
- Lagheri KA, Sial MA, Arain MA, Khenzade SD and Cheme SA (2012). *Pakistan J. Agri., Agril. Engg., Vet. Sci.*, 28 (2): 124-130.

- Lantos C., Paricsi S, Zofajova A, Weyen J, Pauk J., (2006). Isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) with Hungarian cultivars. *Acta Biol Szeged* 50:31–35
- Lantos C, Bana L, Borde A, Monostari T, Pauk J (2013a). *In vitro* anther culture utilization in Hungarian Triticale breeding program. *Review on Agriculture Rural Development* 2013. Vol. 2 pp.50-55.
- Lantos C., Weyen J., Orsini M. J., Gnad H., Schlieter B., Lein V., Kontowski S., Jacobi A., Mihaly R., Broughton S., Pauk J. (2013b). Efficient application of *in vitro* anther culture for different European winter wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding programmes. *Plant Breeding* 12032: 1-6.
- Lashermes, Engin G and Ortíz Ferrara G (1991). Anther culture of wheat adapted to dry areas of West Asia and North Africa. *J. Genet & Breed.*, 45: 33-38.
- Liu Y, Sheng Z, Liu H, Wen D, He Q, Wang S, Shao W, Jiang RJ, An S, Sun Y, Bendena WG, Wang J, Gilbert LI, Wilson TG, Song Q, Li S (2009). Juvenile hormone counteracts the bHLH-PAS transcription factors MET and GCE to prevent caspase-dependent programmed cell death in *Drosophila*. *Development* 136 (12): 2015-2025.
- Lu YM, Wang CL, Shen M & QF Chen (1999). Effect of irradiation on the formation of calli and regeneration of green plants in rice anther culture. *Acta Agric Zhejiangensis* 9(3): 123–216.
- Maluszynski M, Sigurbjörnsson B, Amanno E, Sitch L and Kamra O (1992). Mutant varieties data bank, FAO/IAEA data base. Part II. *Mutation Breeding Newsl.* 39; 14-17.
- Machii H, Mizuno H, and Hirabayashi T (1998). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 53: 67.
- Maluszynski M, Ahloowalia BS and Sigurbjörnsson B (1995a). Application of *In vivo* and mutation techniques for Crop Improvement. *Euphytica* 85: 303-315.
- Maluszynski M, Van Zanten L, Asir A, Brunner H, Ahloowalia B, Zapata FJ and Weck E (1995b). Mutation techniques in plant breeding. *Proc. Induced Mutations and Molecular Techniques for Crop Improvement*. FAO/IAEA, Austria, Vienna, June 19-23. pp.
- Maluszynski M, Nichterlein K, Van Zanten L and Ahloowalia BS (2000). Officially released mutant varieties the FAO/IAEA Data-base. *Mut Breed Rev* 12: 1–84.

- Meinke DW, Cherry JM, Dean C, Rounsley SD, Koornneef M (1998). *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science* 282,662–682pp.
- Micke A, Donini B and Maluszyonski M (1990). Induced Mutations for crop improvement. *Mutation Breeding Rev.*, 7: 1–41.
- Moieni A, Lokos-Toth K and Sarrafi A (1997). Evidence for genetic control and media effect on haploid regeneration in anther culture of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) callus. *Theoretical and Applied Genetics*, 72; 70–75.
- Morad AA, El-Hashash EF, Hager MA and Ziazaa EI (2011). Inheritance of Yield and Components for Mutated Populations Using Gamma Irradiation in Some Bred Wheat Cultivars. *Agricultural Resarch Journal: Suez Conal University* pp. 123-145.
- 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
- Nellemann C, Corcoran E, Duarte CM, Valdés L, De Young C, Fonseca L, Grimsditch G (2009). Blue Carbon. A Rapid Response Assessment. United Nations Environment Programme, GRID-Arendal ([<http://www.grida.no/publications/rr/blue-carbon/>] Last viewed 3 April 2012).
- Nitsch C, Andersen S, Godrad M, Neutter MG, Sheridan WF (1982). Production of Haploid Plants of *Zea Mays* L. and *Pennisetum* Through Androgenesis. In: Earle ED & Demarly Y (eds.) *Variability in Plant Regeneration from Tissue Culture*. Praeger, New York. pp. 69 – 91.
- Novak JD (1990). Concept maps and vee diagrams: Two metacognitive tools for science and mathematics education. *Instructional Science*, 19, 29-52.
- Ouyang JW, Hu H, Chung CC and Tseng CC (1973). Induction of pollen plants from anthers of *Triticum aestivum* L. cultured in vitro, *Sci Sinica* 16: 79-95
- Ouyang JW, Jia SE, Zhang C, Chen XD and Feng GH (1989). A new synthetic medium (W14 medium) for wheat anther culture. *Annual Report, Institute of Genetics, Academia Sinica (1986-1988)*: 91–92.
- Pauk J, Mihaly R and Puolimatka M (2003). Protocol for wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. *Doubled Haploid Production in Crop Plants*, 59-64.

- Peterson CJ, Graybosch RA, Baenziger PS, Grombacher AW (1992). Genotype and environment effects on quality characteristics of hard red winter wheat. *Crop Science*. 32;98-103.
- Petolino JF, Jones AM, Thompson SA (1997). Selection for increased anther culture response in maize. *Theor. Appl. Genet.*, 76: 157-159.
- Plamenov I, Belchev P and Spetsov (2009). *Cereal Research Communications*. 37 (2), 255-259.
- Rahimi MM and Bahrani A (2011). Influence of Gamma Irradiation on Some Physiological Characteristic and Grain Protein in Wheat (*T.aestivum* L.) *World Applied Sciences Journal* 15(5): 654-659.
- Ranalli P (2012). The role of induced plant mutations in the present era. In: *Induced mutagenesis in plants*. *Biorem., Biodiv. Bioavail.* 6 (Special Issue 1): 1-5.
- Redha A and Talat A (2008). Improvement of Green Plant Regeneration By Manipulation of Anther Culture Induction Medium of Hexaploid Wheat, *Plant Cell Tiss Organ Cult.*92:141–146 DOI 10.1007/s11240-007-9315-3.
- Robert Mihaly, Peter Fonad, Andras Palagyı, Lajos Bona, Csaba Lantos and Janos Pauk (2014). *Review on Agriculture and Rural Development* vol. 3 (1) ISSN 2063-4803.
- Rutger JN (1992). Impact of mutation breeding in rice - a review. *Mut. Breed. Rev.* 8:1-24
- Sadasivaiah RS, Perkovic SM, Pearson DC, Postman B, and Beres BL (2004).Registration of ‘AC Andrew’ wheat. *Crop Sci.* 44, 696-697.
- Saisingtong S, Schmid JE, Stamp P, Büter B (1996). Colchicine- mediated chromosome doubling during anther culture of maize. *TAG Theoretical and Applied Genetics*. 92:1017-1023.
- Sarıer SY (2010). Mısır bitkisinde anter kültürü olanakları üzerine araştırmalar. Yayınlanmamış yüksek lisans tezi, Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 56s.
- Sasaki A, Ashikari M, Ueguchi-Tanaka M, Itoh H, Nishimura A, Swapan D, Ishiyama K, Saito T, Kobayashi M, Khush GS, Kitano H, Matsuoka M (2002). A mutant gibberellin-synthesis gene in rice. *Nature* 416:701–702.

- Sesek S., (1994). Efficiency of Anther Culture Technique in Genetically Wide Material of Winter Wheat (*Triticum aestivum* L.), VIII th Int. Cong. Plant Tissue and Cell Culture, Frieenze-Italy, pp: 88.
- Shariatpanahi ME, Bal U, Heberle-Bors E and Touraev A (2006). Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards in vitro embryogenesis. *Physiol.Plantar.* 127, 519-534.
- Slusarkiewicz-Jarzina A and Ponitka A (2007). The Effect of Physical Medium State On Anther Culture Response In Polish Cultivated Oat (*Avena Sativa* L.) *Acta Biologica Cracoviennsia Series Botanica* 49/2: 27–31.
- Sunderland N (1974). Anther culture as a means of haploid induction. In: Haploids in higher plants: Application and potential Ed: KJ Kasha. Univ. of Genelph, pp: 91-12.
- Szakacs E, Kovacs G, Pauk J and Barnabas B (1988). Substitution analysis of callus induction and plant regeneration from anther culture in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell. Rep.*, 7:127–129.
- Szarejko I (2003). Doubled haploid mutant production. Doubled haploid production in crop plants, Eds: Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP, Szarekjo I, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, pp 351–361.
- Szarejk I and Forster BP (2007). Doubled haploidy and induced mutation. *Euphytica* 158, 359-370.
- Tiwari S and Rahimbaves I (1992). Comparison of glucose, sucrose and maltose for (*Hordeum vulgare* L.) isolated microspore culture using different methods. *Indian Journal of Experimental Biology*, 30: 624-627.
- USDA (2014). Household Food Security in the United States in 2013. Economic Research Report Number 173, Coleman-Jensen, A., Gregory, C. and A. Singh (ed.). A report summary from the Economic Research Service. pp. 1-30.
- Wang LM, Lu JP, Chu ZQ, Cui YY, Ren XH (2007). Production of conjugated linoleic acid by *Propionibacterium freudenreichii*. *Food. Chem.* 103(2): 313-318.
- Worland AJ and Law CN (1991). Adult Plant Resistance to Rusts and Mildew in Wheat. Annual Report. Norwich, UK: John Innes Institute.
- Worobey M and Holmes E C (1999). Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. *J Gen Virol*, 80: 2535-2543.

- Weyen J (2009). Barley and wheat doubled haploids in breeding. In: Advances in haploid production in higher plants, 179- 187. Kluwer Academic Publishers.
- Xu X, Liu X, Ge S, Jensen JD, Hu F, Li X, Dong Y, Gutenkunst RN, Fang L, Huang L, Li J, He W, Zhang G, Zheng X, Zhang F, Li Y, Yu C, Kristiansen K, Zhang X, Wang J, Wright M, McCouch S, Nielsen R, Wang J, Wang W (2012). Resequencing 50 accessions of cultivated and wild rice yields markers for identifying agronomically important genes. *Nat. Biotechnol.* 30:105–111.
- Yeh FC, Yang RC and Boyle T (1999). POPGENE 32-version 1.31. Population Genetics Software. <http://www.ualberta.ca/> Yeh, F.C., R.C. Yang and T. Boyle, 1999. POPGENE 32-version 1.31. Population Genetics Software. <http://www.ualberta.ca/>
- Zamani I, Kovacs G, Gouli-Vavdinoudi E, Roupakias D and Barnabás B, (2000). Regeneration of fertile doubled haploid plants from colchicine-supplemented media in wheat anther culture. *Plant Breed.* 119:461–465.
- Zhang Chen G, Yinggeng Y, Yiming G and Jinxing L (2000). Anther culture and haploid breeding of maize. *Chinese academy of sciences, Institute of Botany China*, 31:447-455.

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Tekirdağ'ın Çorlu ilçesinde doğdu. İlkokul, ortaokul ve lise öğrenimini Tekirdağ'ın Çorlu ilçesinde tamamladı. Öğrenim hayatına erken yaşta başlaması sebebiyle; 2003 yılında Trakya Üniversitesi Tekirdağ Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümünü kazanarak yüksek öğrenimine devam etti. 2007 yılında mezun oldu ve aynı yıl Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Bölümünde yüksek lisans eğitimine başladı. 2009 yılında askerlik görevini tamamladı. 2010 yılında yüksek lisans eğitimini tamamlayarak yine aynı yıl doktora eğitimine devam etti. Bir yıl süre ile bir kompoze gübre firmasının bölge satış sorumlusu olarak çalıştı. Namık Kemal Üniversitesi'nde 2010 yılı ağustos ayında başlayan "Melez Mısır Hatlarında Dihaploid Hatların Elde Edilmesi ve Kullanılması" konulu TÜBİTAK projesinde doktorant bursiyer olarak iki yıl görev aldı. 2013 yılında gübre, tohum ve ilaç şirketi ortaklığı bünyesinde satış, teknik destek gibi görevlerde bulundu. Bu süreç içerisinde Macaristan'ın Szeged kentinde bulunan GK Tahıl Araştırma Enstitüsünde doktora tezi için araştırmalarda bulundu. 2015 yılı itibari ile özel şirketten ayrılp Ziya Organik Tarım İşletmelerinin AR-GE müdürü oldu. Daha sonra Yerli bir zirai ilaç sanayinde Avrupa danışmanı olarak göreve başladı. Halen bu görevde çalışmakta ve Tekirdağ Saray ilçesinde şahsi çiftçiliğine devam etmektedir.