

**BAZI BUĞDAY MELEZ
POPULASYONLARININ ANTER
KÜLTÜRÜNE YANITLARI**

Feyza ÇAY

**Yüksek Lisans Tezi
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. İsmet BAŞER
TEKİRDAĞ-2012**

T.C.

NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI BUĞDAY MELEZ POPULASYONLARININ ANTER KÜLTÜRÜNE
YANITLARI

Feyza ÇAY

TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Prof. Dr. İsmet BAŞER

TEKİRDAĞ-2012

Her hakkı saklıdır.

Prof. Dr. İsmet BAŞER danışmanlığında, Feyza ÇAY tarafından hazırlanan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Tarla Bitkileri Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

Juri Başkanı : Prof. Dr. Kayıhan Z. KORKUT

İmza :

Üye : Prof. Dr. İsmet BAŞER

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Mustafa MİRİK

İmza :

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Doç. Dr. Fatih KONUKCU
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAZI BUĞDAY MELEZ POPÜLASYONLARININ ANTER KÜLTÜRÜNE YANITLARI

Feyza ÇAY

Namık Kemal Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İsmet BAŞER

Çalışmada, 3 ekmeklik buğday melez popülasyonunda iki farklı çiçek tozu gelişim döneminin anter kültürüne etkisi ve 4 makarnalık buğday melez popülasyonunda anter kültürüne iki farklı başlangıç ortamının etkisi araştırılmıştır. Buna ilave olarak çalışmada W₁₄F besi ortamı kullanılarak erken tek çekirdekli döneminde olan 12 ekmeklik buğday melez popülasyonunun anter kültürüne yanıtı belirlenmiştir.

Çalışmada, anterlerden gelişen kallus, albino bitkicik, yeşil bitkicik ve seraya aktarılan bitki sayıları belirlenmiştir. İki farklı besi ortamının (W₁₄F, C₁₇F) anter kültürü üzerine etkileri incelendiğinde kallus sayısında besi ortamının etkisi önemli bulunurken, albino bitkicik, yeşil bitkicik ve seraya transfer edilen bitki sayısı üzerine etkisi önemsiz bulunmuştur.

Çiçek tozu gelişim dönemlerinin anter kültürü üzerine etkisi incelendiğinde ise erken tek çekirdekli dönemde çiçek tozu içeren anterlerden sonraki dönemlere göre daha yüksek yeşil bitkicik ve seraya aktarılan bitki sayısı elde edilmiştir. Oniki buğday melez popülasyonunun anter kültürüne yanıtı incelendiğinde melez popülasyonlar arasında istatistik olarak önemli farklılık olduğu belirlenmiştir.

Yapılan önemlilik testi sonucunda melez popülasyonlar arası ve yeşil bitkicik yanıtı açısından farklılık istatistik olarak önemli bulunmuştur. Yeşil bitkicik sayısı 1.50-70.50 adet arasında, seraya aktarılan bitki sayısı ortalama olarak 1.00-59.25 adet arasında değişmiştir. En fazla bitkicik sayısı ve seraya aktarılan bitki sayısı 70.50 adet ve 59.25 ile Golia/Syrena melez popülasyonundan elde edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Androgenesis, haploid, besi ortamı, kallus, anter kültürü.

2012 , 64 sayfa

ABSTRACT

MSc. Thesis

RESPONSES OF SOME WHEAT HYBRID POPULATIONS TO ANTHER CULTURE

Feyza ÇAY

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

Supervisor: Prof. Dr. İsmet BAŞER

The objectives of this study were to determine the effects of two different pollen development periods to the anther culture in 3 bread wheat hybrid populations and to determine the effects of two different induction mediums to the anther culture in four durum wheat hybrids. In addition to this, response of twelve bread hybrid wheat populations in their early uninucleate period to anther culture were determined by using W₁₄F medium.

In the study, the number of calluses which developed from anthers, albino plantlets, green plantlets and the plants which transferred to the greenhouse were determined. Based on the results of the study, the effects of two different mediums (W₁₄F, C₁₇F) on number of calluses were statistically significant. However, the effects of two different mediums on number of albino plantlets, green plantlets and the plants which transferred to the greenhouse were not statistically significant.

Anther culture with pollens in their early uninucleate period produced higher numbers of green plantlets and plants which transferred to the greenhouse comparing to later stage (mid uninucleate period). It was found out that the differences among responses of twelve bread wheat hybrid populations to the anther culture were statistically significant.

Based on the analysis of LSD, the differences between hybrid populations and the responses about in terms of green plantlets found statistically significant. Green plantlets numbers changed between 1.50 to 70.50, in case of the plants which transferred to the greenhouse numbers changed between 1.00 to 59.25. The maximum numbers of plantlets and the plants which transferred to the greenhouse, obtained from Golia/Syrena hybrid population respectively 70.50 units and 59.25 units.

Keywords : Androgenesis, haploidy, medium, callus, anther culture.

2012 , 64 pages

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ	iv
RESİMLER DİZİNİ.....	v
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	7
3. MATERYAL ve YÖNTEM	14
3.1. Materyal.....	14
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.....	17
3.2.1.3. Ön soğuk uygulama.....	18
3.2.1.4. Besi ortamının hazırlanması.....	19
3.2.1.5. Sterilizasyon.....	19
3.2.1.6. Anterlerin besi ortamına aktarılması.....	21
3.2.1.7. Anterlerin inkübasyonu.....	22
3.2.1.8. Kallusların gelişimi ve rejenerasyon ortamına aktarılması.....	24
3.2.1.9. Kalluslardan gelişen albino ve yeşil bitkiciklerin sayılarının belirlenmesi ve test tüplerine aktarılması.....	25
3.2.1.10. Test tüplerinde gelişen bitkilerin toprak bulunan küçük tüplere aktarımı ve vernalizasyon yapılması.....	27
3.2.1.11. Bitkilerde ploidi düzeyinin belirlenmesi.....	29
3.2.1.12. Haploid bitkilerde kromozom katlaması.....	31
3.2.1.13. Bitkilerin seraya aktarılması.....	34
3.2.1.14. Bitkilerin hasat edilmesi.....	35
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	36
4.1. Besi ortamı.....	39
4.1.1. Kallus sayısı.....	39
4.1.2. Albino bitkicik sayısı.....	41
4.1.3. Yeşil bitkicik sayısı.....	42
4.1.4. Seraya aktarılan bitkicik sayısı.....	43
4.2. Çiçek tozu gelişim dönemi.....	44
4.2.1. Kallus sayısı.....	44
4.2.2. Albino bitkicik sayısı.....	46
4.2.3. Yeşil bitkicik sayısı.....	48
4.2.4. Seraya aktarılan bitki sayısı.....	49
4.3. Ekmeklik buğday melez popülasyonlarında anter kültürüne yanıt.....	51
4.3.1. Kallus sayısı.....	51
4.3.2. Albino bitkicik sayısı.....	52
4.3.3. Yeşil bitkicik sayısı.....	54
4.3.4. Seraya aktarılan bitki sayısı.....	55
5. SONUÇ	57
6. KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ.....	64

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Kullanılan melezler.....	14
Çizelge 3.2. Kullanılan besi ortamları içerikleri.....	15
Çizelge 4.1. Dört makarnalık buğday çeşidinin iki farklı besi ortamında anter kültürüne yanıtları.....	36
Çizelge 4.2. Üç ekmeklik buğday melezinin iki farklı çiçek tozu gelişim döneminde anter kültürüne yanıtları.....	37
Çizelge 4.3. Oniki ekmeklik buğday melezinin anter kültürüne yanıtları.....	38
Çizelge 4.4. Dört makarnalık buğday F ₃ popülasyonunda farklı besi ortamlarında elde edilen kallus sayıları için varyans analizi	39
Çizelge 4.5. Dört makarnalık buğday F ₃ popülasyonunda farklı besi ortamında elde edilen kallus sayısında önemlilik grupları	40
Çizelge 4.6. Dört makarnalık buğday F ₃ popülasyonunda farklı besi ortamında elde edilen albino bitkicik sayısında önemlilik grupları	41
Çizelge 4.7. Dört makarnalık buğday F ₃ popülasyonunda farklı besi ortamında elde edilen yeşil bitkicik sayıları.....	42
Çizelge 4.8. Dört makarnalık buğday F ₃ popülasyonunda farklı besi ortamında elde edilen seraya aktarılan bitki sayısı.....	44
Çizelge 4.9. Üç ekmeklik buğday F ₃ popülasyonunda farklı besi ortamında elde edilen kallus sayıları için varyans analizi.....	45
Çizelge 4.10. Üç ekmeklik buğday F ₃ popülasyonunda farklı besi ortamında elde edilen kallus sayısında önemlilik grupları.....	45
Çizelge 4.11. Üç ekmeklik buğday F ₃ popülasyonunda farklı besi ortamında elde edilen albino bitkicik sayıları için varyans analizi.....	46
Çizelge 4.12. Üç ekmeklik buğday F ₃ popülasyonunda farklı besi ortamında elde edilen albino bitkicik sayısında önemlilik grupları.....	47
Çizelge 4.13. Üç ekmeklik buğday F ₃ popülasyonunda farklı besi ortamında elde edilen yeşil bitkicik sayısı için varyans analizi.....	48
Çizelge 4.14. Üç ekmeklik buğday F ₃ popülasyonunda farklı besi ortamında elde edilen yeşil bitkicik sayısında önemlilik grupları.....	48
Çizelge 4.15. Üç ekmeklik buğday F ₃ popülasyonunda farklı besi ortamında elde edilen kallus sayıları için varyans analizi.....	49
Çizelge 4.16. Üç ekmeklik buğday F ₃ popülasyonunda farklı besi ortamında elde edilen seraya aktarılan bitki sayısında önemlilik grupları.....	50
Çizelge 4.17. Oniki ekmeklik buğday F ₃ popülasyonlarında elde edilen kallus sayıları için varyans analizi.....	51
Çizelge 4.18. Oniki ekmeklik buğday F ₃ popülasyonlarında elde edilen kallus sayılarında önemlilik grupları.....	51
Çizelge 4.19. Oniki ekmeklik buğday F ₃ popülasyonlarında elde edilen albino bitkicik sayıları için varyans analizi.....	52
Çizelge 4.20. Oniki melez buğday F ₃ popülasyonlarında albino bitkicik sayısında önemlilik grupları.....	53
Çizelge 4.21. Oniki ekmeklik melez buğday F ₃ popülasyonlarında elde edilen yeşil bitkicik sayıları için varyans analizi.....	54
Çizelge 4.22. Oniki melez buğday F ₃ popülasyonlarında yeşil bitkicik sayısında önemlilik grupları.....	54
Çizelge 4.23. Oniki ekmeklik melez buğday F ₃ popülasyonlarında elde edilen seraya aktarılan bitki sayıları için varyans analizi.....	55
Çizelge 4.24. Oniki ekmeklik buğday F ₃ popülasyonunda seraya aktarılan bitki sayıları için önemlilik grupları.....	56

RESİMLER DİZİNİ

Resim 3.1. Mikrospor gelişim dönemleri.....	18
Resim 3.2. Ön soğuk uygulaması yapılmış ve sterilizasyona hazır başaklar.....	20
Resim3.3. Buğday başaklarında sterilizasyon öncesi yaprak ve kılçıkların uzaklaştırılması.....	20
Resim 3.4. Başakların % 2'lik sodyum hipokloridle sterilizasyonu.....	21
Resim 3.5. Başlangıç ortamına aktarılan anterler.....	22
Resim 3.6. Anterlerin 3 gün süre ile 32 °C'de inkübatörde bırakılması.....	23
Resim 3.7. Anterlerin inkübatörde 28 °C'de bırakılması.....	23
Resim 3.8. Elde edilen kalluslar.....	24
Resim 3.9. Yeni besi ortamına aktarılmış kalluslar.....	25
Resim 3.10. Kalluslardan gelişen yeşil bitkicikler.....	26
Resim 3.11. Gelişen yeşil bitkiciklerin test tüplerine aktarımı.....	26
Resim 3.12. Test tüplerine aktarılan yeşil bitkicikler.....	27
Resim 3.13. Test tüplerinde gelişen bitkilerin küçük saksılara aktarımı.....	28
Resim 3.14. Bitkilerde iklime alıştıırma.....	28
Resim 3.15. Vernalizasyon ihtiyacı olan bitkilerin soğuk odada tutulması.....	29
Resim 3.16. Fenotipik olarak haploid ve double haploid bitkiler.....	30
Resim 3.17. Stoma hücrelerine bakarak ploidi düzeyinin belirlenmesi.....	31
Resim 3.18. Bitkilerin köklerinin kısaltılması.....	32
Resim 3.19. Kısaltılan bitki köklerinin hazırlanan solüsyonda bekletilmesi.....	32
Resim 3.20. Bitkilerin akan çeşme suyu altında yıkanması.....	33
Resim 3.21. Bitkilerin tekrar toprağa aktarılması.....	33
Resim 3.22. Serada yetişen bitkicikler.....	34
Resim 3.23. Hasat zamanında double haploid ve haploid bitkiler.....	35

1. GİRİŞ

Buğday, *Graminea* familyasından, çiçeklenmesi başak şeklinde, tohumları kullanılabilen, ülkemizde geniş bir alanda kültürü yapılan bir yıllık otsu bitkidir.

Geniş adaptasyon yeteneği yanında besleme değerinin yüksek olması, işleme ve depolama kolaylığı nedeniyle dünyada diğer kültür bitkileri içerisinde ekiliş ve üretim bakımından ilk sırada olan buğdayın 2009 yılında ekiliş alanının azalmasına karşılık üretim miktarı 20.6 milyon tona yükselerek dekara verim 254 kg/da olmuştur (Anonim 2010).

İnsan beslenmesi açısından yaşamsal öneme sahip olan tahıllarda, verim ve kalite sorunlarının çözülmesi için genetik varyabilitenin sınırına yaklaşılmıştır. Bu sebeple, önemli kültür bitkilerinin ıslahında kullanılacak yeni ve daha geniş varyabiliteye ihtiyaç vardır. Bunu elde etmek, ıslah süresinin etkinliğini artırmak ve ıslah süresini kısaltmak için yeni teknolojilere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu teknolojiler içinde en fazla yararlandığımız ise biyoteknolojidir.

Günümüzde ıslah edilecek buğday çeşitlerinde verim, kalite ve hastalıklara tolerans gibi birçok özelliğin bir arada olması hedeflenmektedir. Bu amaçları başarmak için ıslahçılar geleneksel ıslah tekniklerine yeni bitki biyoteknolojik metotları da entegre etmeye çalışmaktadırlar.

Biyoteknolojinin temelleri totipotensi teorisi ile başlamıştır. Tek bir hücreden bölünme ve farklılaşma yoluyla organ ve tam bitki elde etme potansiyeline “totipotensi” denir.

Doku kültürü çalışmalarında bitkilerin eşeysel olarak çoğalabilmelerinin yanısıra gövde, dal, yaprak gibi herhangi bir parçasından eşeysiz olarak da çoğalabilme (totipotensi) özelliği, onların *In vitro* koşullarda, uygun besin ortamı içeriğiyle tüm bitki şeklinde gelişmelerini olası hale getirmektedir. Steril koşullarda ve uygun besi ortamında, tek bir anaçtan istenildiği kadar çoğaltım yapılmasına olanak sağlamaktadır. Doku kültürü tekniklerinin, bitkileri, genetik potansiyellerinin amaca uygun yönlendirilmesi açısından büyük önem taşıdığı anlaşılmaktadır (Acar 1997).

Bitki ıslahı çalışmalarında, başarıyı etkileyen iki önemli konu vardır. Bunlar; varyasyon ve seleksiyondur. Varyasyon, küçük değişmelerle yıllar boyunca kendiliğinden olduğu gibi; melezleme, mutasyon ve poliploidi ile de yapay olarak oluşturulabilir. Seleksiyon amaca uygun bitkilerin seçilmesidir. Seleksiyon yapılırken sürekli kontrolle karşılaştırma yapılır. O yörede yetişen standart çeşitleri aşabilen materyaller seçilerek, daha üstün çeşitlerin geliştirilmesi sağlanır. Son yüzyılda, klasik ıslah yöntemlerinden yararlanılarak üstün verimli ve kaliteli birçok çeşit geliştirilmesine rağmen başta hastalık ve zararlılar olmak üzere bazı biyotik ve abiyotik çevresel baskılara karşı dayanıklılıkta istenilen sonuca ulaşamamıştır (Özgen ve ark. 2000).

Biyoteknolojik yöntemler ile bitkilerin tarımsal niteliklerinin geliştirilmesi amacıyla laboratuvar koşullarında uygulanan doku kültürü teknikleri, zamanla tarla koşullarında yapılan çalışmalarda karşılaşılan sorunların giderilmesinde kullanılmaya başlanmıştır. Sonuçların daha kısa sürelerde alınabildiği, bitkilerin hücre, doku ve çeşitli organlarının kullanıldığı bu çalışmalarda, bitkilere biyoteknolojik sistemler için gelişmiş tüm yöntemler uygulanabilmektedir.

Bitki biyoteknolojisindeki ciddi gelişmeler 1900'lü yıllarda başlamıştır. 1902'de Haberlandt ilk aseptik kültür denemesini, White 1934'te ilk kök kültürü denemesini gerçekleştirmiştir. Gautheret ve Nobecourt *Daucus carota* (havuç) ile 1939'da ilk bitki kültürünü yapmışlardır. 1954 yılında Murashige ve Skoog yeni bir besi ortamı geliştirmişlerdir. 1960 yılında Maheswari anter, Cocking protoplast kültür denemelerini gerçekleştirmişlerdir. Watson ve Crick tarafından genetik yapıların moleküler düzeyde tanımlanması, özellikle bitkilerde moleküler tekniklerin kullanılmasının önünü açmıştır (Vasil ve Therge 1994).

Somatik hücrelerdeki kromozom sayısı, ait oldukları bitki türünün gamet hücrelerinde bulunan kromozom sayısı kadar olan bitkilere haploid bitkiler adı verilir. Haploidler gametik kromozom setinin birini içerirler ve bu özellikleri sayesinde ıslah çalışmalarında önemli yer tutmaktadırlar.

Günümüzde haploid bitkilerin elde edilmesinde anter kültürü yaygın olarak kullanılan bir biyoteknolojik yöntemdir.

Bir hücrede haploidlerin tarihi A.D. Bergner tarafından 1921'de rapor edilmiş olan *Datura stromonium* L.'un haploid üretimini gözlemlemesiyle başlamıştır. Daha sonra bunu *Nicotiana tobacum* (Clausen ve Mann 1924) ve *Triticum compactum* (Gaines ve Aase 1926) gibi bazı türlerde gözlem ve keşifler izlemiştir.

Haploidler konusunda ilk başarılı uygulamalar; *Datura* anterlerinin kullanımından haploid embriyo ve bitkilerin elde edilmesi ile Guha ve Mahershwari tarafından 1964'te elde edilmiştir.

Haploidlerin kullanımının kazandırdığı en önemli avantajı, tam bir homozigotiye elde etme olanağı sunmasıdır. Dihaploid hatların kullanılmasıyla genetik ve ıslah çalışmalarını yapmak hızlanmakta ve kolaylaşmaktadır. F₁ çeşitlerinin geliştirilmesinde homozigot hatlar arasında üstün kombinasyon yeteneği verenlerin belirlenmesi yöntemi kullanıldığından, haploidinin hibrit çeşit ıslahında özel bir önemi bulunmaktadır. Dihaploid bitkilerden elde edilen saf hatlar F₁ çeşit ıslahında ebeveyn olarak kullanılabilir.

Kombinasyon ıslahında da sonuca çok kısa sürede ulaşmayı sağlayan haploidi seviyesinde F₁ kademesindeki melez bitkilerden haploid çekerek farklı genotiplerde bulunan ve tek bir genotipte bulunması arzu edilen özelliklere sahip bitkiler kazanılması mümkündür. Özellikle yabancı döllen bitkilerde heterozigoti oranı çok yüksek olduğundan bunlarda homozigot hatların elde edilebilmesi için 7-10 generasyon boyunca kendileme yapmak gerekmekte, kendine dölenen bitkilerde bile aynı amaç için 5-7 generasyon boyunca kendileme işlemine gerek duyulmaktadır ancak dihaploidizasyon yöntemi devreye girdiğinde homozigot hatlara tek generasyonda ulaşmak olasıdır.

Haploid bitkiler farklı patojen ve bunların fizyolojik ırklarına karşı *In vitro* seviyede seçime olanak vermekte, hastalıklara dayanıklılık çalışmalarında zaman, yer ve maddi kazanç sağlamaktadır.

Fazla miktarda haploid bitki üretimi sağlayacak olan anter kültürü ile istenilen homozigot hatların seçimi ve yeni çeşitlerin geliştirilmesi mümkündür. Haploid bitkiler genetik analizlerde, ıslah çalışmalarında ve benzer çalışmalarda kullanılan genetik materyallerdir.

Gramineae familyası içerisinde yer alan tahıl ve buğdaygil yem bitkilerinde uygulanan doku kültürü teknikleri; kallus kültürü, embriyo kültürü, anter kültürü, hücre süspansiyon kültürü ve protoplast kültürü olarak sayılabilir. Kallus kültürü, bitkilerin değişik organ dokularının kallus (farklılaşmamış hücre yığını) oluşturmaya teşvik edilmesidir. Kallus elde etmek için kök, kotiledon, hipokotil, yaprak ayası, damar, çiçek durumu, embriyo (olgun ve olgunlaşmamış), gövde segmentleri vb. bitki kısımları eksplant olarak kullanılmaktadır. Kallus embriyogenik olabilir veya olmayabilir. Ancak, kallus dokusundan bitki rejenerasyonu için embriyogenik kallus önem taşımaktadır.

Kallus türleri, *In vitro* çoğaltımda, kültürde ortaya çıkan somaklonal varyasyondan yararlanmada, hücre süspansiyon kültürlerinin oluşturulması ve gen transferlerinin uygulanabilmesi amacıyla kullanılmaktadır (Bürün 1996).

Anter kültürü, içerisinde olgunlaşmamış polenleri bulunduran anterlerin, tomurcuklarından ayrılarak *In vitro* koşullarda yapay besin ortamlarına yerleştirilmesi ve burada olgunlaşmamış polenlerden haploid embriyolar elde edilmesine verilen isimdir.

Anter kültürünün temel prensibi, normal koşullarda iki çekirdekli yapıya dönüşecek olan polenin gametik gelişme yönü; henüz tek çekirdekli dönemdeyken somatik gelişim yönüne doğru çevrilmekte ve böylece “*androgenesis*” olarak adlandırılan oluşum gerçekleşmektedir. Androgenesiste en zor oluşum gametofik safhadan sporotifik safhaya geçiştir

Anter kültürü veya dihaploid elde etmede amaçlardan biri eldeki materyali en hızlı şekilde homozigot hale getirmektir. Haploid bitkilerin colchicine gibi kimyasallar ile katlanması sayesinde % 100 homozigot saf hatlar elde edilir.

Anter kültürü, yaygın olarak desteklenen, buğdaydaki gelişmeler için homozigot double haploid hatlar üretmekte kullanılır ve bu son birkaç yıl içinde birçok ıslah programı arasında gitgide önemli bir teknik haline gelmiştir (Henry ve De Buyser 1990).

Buğday, en önemli besin maddelerden biri olması nedeniyle, *In vitro* kültürde rejenerasyonu çok çalışılan bir bitkidir (Delporte ve ark. 2001). Buğdayın doku kültüründe kallus oluşturması ve oluşan kalluslardan bitki rejenerasyonu genellikle eksplant kaynağı,

genotip ve kültür ortamına bağlıdır (Özgen ve ark. 1998). Genotipin etkisi hücrenel veya sitoplazmik bileşenlerden kaynaklanmaktadır. Buğdayda doku kültürü yanıtı tek veya birkaç kromozomla kontrol edilir (Özgen ve ark. 2001).

Buğdayda farklı eksplant kaynakları somatik kallus kültürü için kullanılmaktadır. Bu eksplant arasında olgunlaşmış embriyo, olgunlaşmamış yaprak ve çiçek durumu, mezokotil, tohum, apikal meristem (Özgen ve ark. 1996), anter ve izole edilmiş mikrosporlar (Delporte ve ark. 2001) bulunmaktadır. Bu dokuların bütün bir bitkiye rejenere olabilme kabiliyeti birbirinden farklıdır (Delporte ve ark. 2001).

Kendine döllen bitkilerde, adapte olmuş çeşitlerin eksik ya da uygun olmayan karakterlerini ıslah etmek amacıyla kullanılan geri melezleme yoluyla ıslahta, melez bitkinin 5-6 generasyon adapte olmuş çeşit ile melezlenmesi ve daha sonrada kendileme ile saf hatların elde edilmesi gerekmektedir. Böyle bir ıslah programında, DNA markörlerine dayalı seleksiyon ve haploid sistemi kullanılarak kısa sürede adapte olmuş çeşidin uygun olmayan karakterleri ıslah edilebilmektedir.

Yabancı döllen bitkilerde melez çeşit ıslahında ise, ebeveyn olarak kullanılacak saf hatlarda haploid teknikleri ile haploid bitkilerin elde edilmesi ve elde edilen bitkilerde kromozom katlaması yapılarak kısa sürede çok sayıda haploid bitki elde edilebilmesi sağlanmaktadır. Buna karşılık söz konusu bitkilerde klasik yöntemle saf hat eldesi 8-10 generasyon kendileme ile mümkün olabilmektedir.

Birçok önemli bitkide olduğu gibi buğdayda da anter kültürü gibi özel doku kültürü metotları homozigot hatların üretiminde etkili olabilmektedir. Buğdayda *In vitro* androgenesis yoluyla tek bir generasyonla homozigot hatlar geliştirilmektedir. Bu yöntemle ıslahçıların melezlemeden sonra homozigot hatlar elde etmek için harcadıkları süre en az 4-5 yıl azalmış, bu da ıslahçılara oldukça fazla bir zaman tasarrufu sağlamıştır. Bununla birlikte tarla denemelerinde homozigot hatlar daha gerçekçi agronomik performans gösterdiklerinden daha etkili bir seleksiyon yapılabilmektedir. Buğdayın klasik ıslahındaki mevcut sorunları aşabilmek için, doku kültürü ve biyoteknolojik yöntemlerden yararlanmak kaçınılmazdır. Genetik mühendisliği tekniklerinden yararlanılarak gen aktarmada önemli bir adım olan

kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu çalışmalarında başarının büyük ölçüde genotip ile bağlı olduğu bilinmektedir (Şehirli ve Özgen 1998).

Bu çalışmada, 19 farklı buğday melezinde, farklı çiçek tozu gelişim döneminin, farklı başlangıç besi ortamlarının ve farklı buğday melez kombinasyonlarının anter kültüründe yanıt üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Androgenesis, erkek gamet hücresine ait mikrosporların sporatifik gelişime yönlendirilmesidir. Mikrospor normal olarak vejetatif ve generatif olmak üzere 2 çekirdek içeren çiçek tozu hücresine dönüşmek için programlanmıştır. Androgenesiste her bir gelişim safhasında sporofitik gelişime yönlendirilip totipotent özellik ile döl eldesi ana amaçtır. Androgenesis sürecinde çoğu yöntem 2 ana *In vitro* safhadan ibaret olup birincisi androgenik sürece indüksiyon, ikincisi haploid ya da double haploid rejenerasyonudur. İndüksiyon safhasında bitkilere sıklıkla ön uygulamalar yapıp bunu rejenerasyon safhasında *In vitro* köklenme izler. Mikrospor gelişim safhasında direkt olarak androgenik embriyo oluşabilir bu da literatürde “ embriyoya benzeri yapı “ (ELS) olarak geçer. Embriyoya benzer yapı uygun kültür şartlarında çimlenerek direkt olarak bitkiye dönüşür.

Kapalı tohumlu bitkilerde kısa bir gametofitik safha ve tamamen sporatifik safhaya bağlı bir yaşam vardır. Erkek gametofitler bitkilerden çiçek tozu ya da mikrospor oluşturmak üzere gönderilirler. Çiçek tozları haploid yapıda olup her bir genden tek bir kopyaya sahiptir. Erkek gametofit fonksiyonlarını uygun şartlar altında androgenesis meydana getirmesi, başlı başına çiçek tozlarının sporofitik gelişim yeteneğine bağlıdır. Spontan haploid bitkiler, iki ebeveyninden gelen iki set kromozomdan ziyade tek ebeveyninden gelen tek set kromozom içerirler.

İlk kez 1953 yılında Tulecke *Ginkgo biloba* bitkisine ait olgun çiçek tozlarının kültür koşullarında haploid kallus oluşturmak üzere uyarılabileceğini gözlemlemiştir (Tulecke 1953).

1964 yılında ilk önemli gelişmeyi Guha ve Maheshwari gerçekleştirmiş, *Datura innoxia* bitkisinin kültüre alınan anterlerinde mikrosporlarından haploid embriyo oluşumu sağlamıştır (Guha ve Maheshwari 1966).

Anter kültürüne yanıt birçok genotipin yanıtsız olmasıyla yüksek oranda genotipe bağlıdır. Yanıt yeteneği yüksek genotiplerin anterlerinin % 18’inden daha fazla yanıt alındığı bazı sonuçlarda belirtilmiştir (Genovesi ve Collins 1982).

Bazı çalışmalarda da anter kültürüne yanıtta dominant genler tarafında kontrol edilen basit bir kalıtıma sahip özellik olarak bahsedilmektedir (Afele ve Kannenberg 1990). Hızlı

genetik kazançla ilgili olan bu öneriler yanıtı düşük olan germplazma yanıtı yüksek olanlardan bu karakter transfer edilebilir.

1973'de anter kültürü ile buğdayda katlanmış haploid bitki üretimi başladıktan sonra haploid bitki üretimi gitgide artış göstermiştir. Birçok ülkede başarılı sonuçlar alınmış, bu teknikle 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) geliştirilerek çiftçilerin hizmetine sunulmuştur.

Bunu izleyen yıllarda birçok çalışma yapılmış ve yaklaşık 250 farklı bitki türünde *In vitro* androgenesis (erkek gametten haploid uyartımı) tekniğinden başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Bajaj 1983, George ve Sherrington 1984, Pierik 1989).

Maddock ve ark. (1983), farklı buğday genotipleri üzerinde sürdürdükleri araştırmada; genç başaklardan kallus oluşturma oranlarının genotipe bağlı olarak değiştiğini ve oluşan rejenerantlarda fenotipik varyasyon gözlendiğini bildirmektedirler.

Anter kültüründe yanıt büyük oranda anterlerin alındığı bitkinin genotipik yapısına bağlıdır (Tomes 1990, Razdan 1992, Saidi ve ark. 1997). Bu nedenle anter kültüründe haploid bitki üretilmek istenen genotipten yüksek düzeyde androgenetik yanıt alabilmek için başvurulacak ilk yöntem her genotip için kültür koşullarını optimum hale getirmek (Dunwell 1981), diğeri ise anter kültüründe kallus yada embriyo oluşturma kapasitesi yüksek genotiplerle düşük olan genotipleri melezleyerek melez döllerden yanıtı yüksek olan döleri anter kültüründe kullanmaktır (Henry ve De Buyser 1985).

Lörz (1989), tahıllarda *In vitro* koşullarda yürütülen bitki rejeneasyon çalışmalarında çok hücreli eksplantlarla başarıya ulaşıldığını ve tahıllara alternatif gen aktarım yöntemlerinin uygulanabileceğini belirtmiştir.

Anter kültürünün başarısı genotipe bağlı olarak değişmekle beraber; kallus oluşumu, bitki rejenerasyonu, katlanmış haploid bitki miktarı gibi faktörler de başarıyı etkilemektedir (Szakacs ve ark. 1989).

Pescitelli ve ark. (1990), yaptıkları bir çalışmada anterlerin izolasyonu tekniğinin, düşük sıcaklık uygulamasının ve sakaroz seviyesinin mısır bitkisinde mikrospor kültürüne etkisini araştırmışlardır. İzolasyon tekniğinde pensler yardımıyla kesilerek alınan anterlerin ezilerek alınan anterlere göre 3 kat daha fazla embriyoya benzer yapı elde edilebileceğini ortaya koymuştur. Ön sıcaklık uygulaması (15°C'de 4 gün) yapılan mikrosporların ön sıcaklık uygulaması yapılmayanlara göre 2 kat daha fazla embriyoya benzer yapı elde edilebileceğini ve ayrıca en yüksek yanıt aldıkları sakaroz konsantrasyonunun % 8-9.5 olduğunu yaptıkları çalışmalar ile ortaya koymuşlardır.

Hassawai ve Liong (1990), buğday ve tritikalede yaptıkları çalışmada; çeşit, inkübasyon sıcaklığı ve çiçek tozu gelişim döneminin anter kültürü üzerine etkilerini araştırmışlardır. İnkübasyon sıcaklığının kallus oluşturma ve bitki rejenerasyonu üzerine fazla etkisinin olmadığını fakat çiçek tozu gelişim dönemi ile çeşit interaksiyonunun kallus oluşumunu önemli derecede arttırdığını bulmuşlardır.

Lashermes ve ark. (1991), Batı Asya ve Kuzey Afrika'dan elde edilen bazı buğday genotiplerinde anter kültürü çalışmalarında; genotipler arasında varyasyon gözlemlendiği elde edilen sonuçların bitki ıslahı çalışmalarında kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Anter kültürüne yanıtın genetik temelini daha iyi anlamak için uygun bitki rejenerasyonu için üç araştırıcı grubu kromozomal bölgeleri belirlemişlerdir. Ayrıca bu kromozomal bölgeler RFLP (restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi) analizi kullanılarak bunlarla ilişkili bölgeler belirlenmiştir (Armstrong ve ark. 1992). Bu bölgeler arasında ikinci kromozomun uzun kolunun en sonunda bir ve sekizinci kromozomun uzun kolunun üzerinde diğer bir bölgenin embriyo benzeri yapı oluşumu ile ilişkili görülebileceğini belirlemişler, diğer dört bölgenin embriyo benzeri yapı ya da kallus oluşumunun biri ya da her ikisi ile ilişkili olabileceğini açıklamışlardır.

Bitki rejenerasyonu ya da anter kültürüne yanıt için birinci ve ikinci kromozomun üzerindeki sentromere yakın bölgelerin önemli olduğu belirlenmiştir (Armstrong ve ark. 1992).

Doku kültürü tekniklerinin bitkilerin genetik potansiyellerinin amaca uygun yönlendirilmesi açısından büyük önem taşıdığı anlaşılmaktadır. Buğdayın klasik ıslahındaki mevcut sorunları aşabilmek için, doku kültürü ve biyoteknolojik yöntemlerden yararlanmak kaçınılmazdır (Özgen ve Akar 1993).

Abd-el Maksoud ve ark. (1993), buğdayda anter kültüründe genotip ve ortamın etkisini inceledikleri çalışmalarında; reaksiyonun genotiplere bağlı olarak ortalama % 0.54 ile % 7.81 arasında değiştiğini, kullanılan farklı ortamlardaki reaksiyon oranlarının da istatistiksel olarak önemli olduğunu saptamış ve diğer pek çok türde olduğu gibi buğdayda da bu tip çalışmalarda reaksiyonda en önemli faktörlerden birinin genotip; ayrıca donör bitkilerin yetiştiği koşullar ve bunların birbiriyle olan etkileşimlerinin de önemli olduğunu bildirmişlerdir.

Hatipoğlu ve ark. (1994), 10 buğday genotipi ile yaptıkları çalışmalarında anter kültürü, rejenerasyon oranının genotiplere bağlı olarak % 0 – 13 arasında değiştiğini ve ortalama % 2.69 olarak gerçekleştirdiğini saptamışlardır.

Hatipoğlu ve Doğramacı (1995), ekmeklik buğdayda (*Triticum aestivum* L.) genotip, besi ortamı ve besi ortamı katılaştırma maddesinin haploid bitki üretimine etkisini saptamak amacıyla yaptıkları anter kültürü çalışmalarında; 10 ekmeklik buğday ve hattından alınan anterleri iki farklı besi ortamı (85 D12 ve P2) ve üç farklı besi ortamı katılaştırma maddesinde (agar, buğday nişastası ve mısır nişastası) kültüre alındıklarını, reaksiyon gösteren anter oranı ve rejenerasyon oranının büyük ölçüde genotip, besi ve besi ortamı katılaştırma maddesinin etkisi altında olduğunu bildirmişlerdir.

Moieni ve ark. (1997), 7 heksaploid buğday genotipinin anter kültürüne iki farklı sıvı ortam (CHB ve W14) ve androgenik uygulamaların etkisini araştırmışlardır. IBPT 19 genotipi her iki ortamda da embriyo oluşumu, yeşil bitki rejenerasyonu ve toplam bitki rejenerasyonu için diğer genotiplerden daha yüksek sonuçlar vermiştir. IBPT 19 genotipinde, CHB ortamında her 100 anterden 68'i embriyo üretirken, W14 ortamında bu sayının 25.6'ya düşmesi anter kültüründe genotip ve ortamın önemli olduğunu ortaya koymuştur.

Machii ve ark. (1998), 107 japon buğday genotipi ile yaptıkları çalışmada; anter ve olgunlaşmamış embriyo kullanarak, kallus ve rejenerasyon oluşumu belirlenmeye çalışmışlardır. Anter kültüründe 107 genotipten 83'ünde kallus oluşumu ve bunlardan da 45'inde bitki rejenerasyonu elde edilmiştir. Olgunlaşmamış embriyo kültüründe ise, genotiplerin % 97'sinde, % 90 oranında kallus oluşumu elde edilirken, anter kültürüne göre daha çok miktarda albino bitki oluşumu saptanmıştır. Araştırmacılar, doku kültüründe bitki rejenerasyonun genotipe göre değiştiğini belirtmişlerdir.

Başer ve ark. (1999), buğdayda anter kültürü üzerine yaptıkları çalışmalarda buğdayda yanıtın genotiplere göre değiştiğini, bazı genotiplerden yüksek yanıt alınırken bazılarında yanıt alınmadığını belirtmişlerdir. Çalışmaya alınan genotiplerde kallus, albino ve yeşil bitkicik sayısının genotiplere göre farklı oranda değişim gösterdiğini ortaya koymuşlardır.

Belli coğrafik bölgelerdeki genotiplerde daha güçlü bir genotip bağıllığının bulunduğu buğdayda anter kültürünün Çin, Avrupa'nın merkezi ve doğusunda kuzey ve batı Avrupa'ya göre daha etkin biçimde kullanılabildiği Holme ve ark. (1999) tarafından ortaya konulmuştur. Doğu Avrupa buğday hatları 100 anter başına 3.6 bitki oluştururken; kuzey-batı Avrupa hatları 100 anter başına 0.4 bitki oluşturmuştur.

Buğdayda anter kültürüne bağlı androjenetik haploidlerin etkili bir şekilde ıslah programlarında kullanılabilmesi için fazla sayıda genotipte ve yeterli sayıda katlanmış haploid bitkinin ekonomik bir şekilde üretilebilmesi gerekmektedir (Barbanas ve ark. 2001).

Korkut ve ark. (2001) yaptıkları çalışmada yerli ve yabancı ekmeklik buğday çeşit ve hatlarında haploid ve dihaploid elde etme olanaklarını araştırmışlardır. Ekmeklik buğday genotiplerinin kallus, albino ve yeşil bitkicik yanıtlarını düşük bulmuşlardır. Yirmibeş genotipten 23'ü kallus geliştirmiştir. Bunlardan 3 tanesinde hiçbir organogenesis görülmemiş, 20 tanesinde ise organogenesis görülmüştür. Yirmi genotipin 15'inden ise yeşil bitkicik elde etmişlerdir.

Katlanmış haploid tekniği kullanılarak arpada 96, kolzada 47, buğdayda ise 20 çeşit geliştirilmiştir (Thomas ve ark. 2003).

Korkut ve ark. (2003) ekmeklik buğday genotiplerinde yaptıkları çalışmalarda anter kültüründe genotiplere göre değişmekle birlikte yüksek oranda yanıtlar elde etmişlerdir.

Konieczny ve ark. (2003), Polonya'nın 10 buğday çeşidinden anter eksplantı kullanarak haploid bitki elde etmek için bir çalışma yapmıştır. En fazla (% 9.1) kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu (% 0.8) Apollo çeşidinden elde edilmiştir. Buradan hareketle kallus oluşumunun ve bitki rejenerasyonunun genotipe göre değişebileceği söylenebilir.

Double haploidlerin ilk üretildiği yıllardan günümüze kadar birçok problem (indüksiyon ortamı, karbon kaynakları gibi) çözülmüştür. Double haploid bitki oranının yalnızca genotipe değil aynı zamanda indüksiyon ortamına bağlı olarak değiştiği (Orshinsky ve Sadasivaiah 1994); ön soğuk uygulamasının doğal katlanmış haploid miktarını artırdığı (Pauk ve ark. 2003) belirtilmiştir.

Avustralya'da olduğu gibi anter kültürü ekmeklik buğday ıslahının vazgeçilmez bir parçası (Çakır ve ark. 2003) olarak kullanılmaktadır.

Belchev ve ark. (2004), double haploid bitki elde edilerek ıslah süresinin kısaltılması için, anter kültüründe elde edilen sonuçların genotipe bağlı olduğunu bildirmişlerdir.

Hassawai ve ark. (2005), buğday bitkisinde, çiçek tozu kallusunun oluşum miktarının ve bitki rejenerasyonunun genotipe bağlı olduğunu belirtmiştir.

Katlanmış haploid bitki üretimi için hala en büyük sorun genotip bağımlılığı olarak görülmektedir (Enginözü 2006, Ahmet ve Adak 2007).

Katlanmış haploidlerin eldesinde en yaygın olarak kullanılan metod bitki türüne bağlı olarak değişim göstermektedir. En başarılı sonuçlar göz önüne alındığında, arpa için embriyo kurtarma, kolza için mikrospor kültürü, buğday için ise anter kültürü en başarılı sonuçların elde edildiği yöntemlerdir. Avrupa'da yetiştirilen arpa çeşitlerinin % 50'sinin katlanmış haploid teknikleriyle geliştirilmiş çeşitler olduğu bildirilmektedir (Foster ve ark. 2009).

Çeltik genotiplerinin anter kültürüne yanıtlarının kullanılan besi ortamına göre değişebileceği; genotiplerin en iyi yanıt verdikleri besi ortamlarının "B5- NAA+2.4 D sıvı" ve

“N6 – NAA+2.4 D sıvı” ortamları olduğu bulunmuştur. Yirmialtı çeltik genotipinin 5 farklı besi ortamında anter kültürü olanaklarını belirlemek amacıyla yapılan çalışma çeltik genotiplerinin anter kültürüne yanıtlarının farklı olduğunu, kullanılan İndika tipi çeltik genotiplerinin anter kültürüne Japonika tipinden daha iyi yanıt verdiklerini göstermiştir (Korkut 2009).

Sarıer (2010), anter kültürü üzerine yaptığı çalışmasında 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 değıştiğini belirtmiştir.

Salantur ve ark. (2011), bazı kışlık ekmeklik buğday F₂ popülasyonlarının anter kültüründe bitki rejenerasyonuna tepkisinin belirlenmesine yönelik çalışmalar yapmışlardır. Araştırma sonuçlarına göre kullanılan 15 popülasyondan katlanmış haploid bitki elde edilmiş, 4 popülasyonda sadece kallus oluşumu gözlenmiş; 2 popülasyon ise anter kültürüne hiçbir tepki göstermemiştir.

Marker destekli seleksiyon ve genetik haritalama çalışmalarında da kullanılan DH popülasyonların üretilmesinde bu yöntem yaygın olarak kullanılmaktadır (Anonim 2011).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Tekirdağ Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü deneme alanında ekmeklik ve makarnalık buğday genotipleri arasında yapılan melezlemeler çalışmada materyal olarak kullanılmıştır. F₁ generasyonunda bitkiler arasında seçim yapılamaması sebebiyle materyal olarak F₂ ve daha sonraki F₃-F₄ generasyonların bitki materyali olarak kullanılmasının uygun olduğu belirtilmiştir (Pauk ve ark. 2003). Bu yüzden araştırmamızda ıslah programında yer alan F₃ buğday popülasyonundan faydalanılmıştır. Tekirdağ Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü deneme alanında F₁ ve F₂ tohumları yetiştirilmiştir. F₃ generasyonu tohumları Macarsitan'da bulunan Tahıl Araştırma Enstitüsü'ndeki deneme alanlarında ekim yapılmıştır. Ekimi yapılan bitkilerde gerekli bakım işlemleri yapılmıştır. Anter kültürü işlemleri uygulanan genotiplerin listesi Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan melezler

Makarnalık Melezler
1) Svevo / Zenit
2) Gediz 75 / Yavaros 79 // IDSN 209
3) Fuatbey / Zenit
4) Svevo / IDSN 165
Ekmeklik Melezler
1) Krasunia / Sana
2) Sana / Krasunia
3) Golia / Syrena
4) Pehlivan / Sana
5) Sadova / Sana
6) F 85 / Sana
7) Pehlivan / F 85
8) Syrena / Krasunia
9) F 85 / Pehlivan
10) Pehlivan / Sadova
11) F 85 / Golia
12) Syrena / Pehlivan
13) Sadova / Pehlivan
14) Pehlivan / Bezostoja 1
15) Krasunia / Syrena

Anter kültürüne yanıtın aynı türler arasındaki genotipler arasında bile farklılık gösterdiği durumlarda ortak besi ortamı önerimi zordur. Bunun için çalışmamızda W₁₄F, C₁₇F ve 190-2 Cu besi ortamları kullanılmıştır. Kullanılan besi ortamlarının içerikleri Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Kullanılan besi ortamları içerikleri (mg / l)

Besi ortamı	W ₁₄ F	C ₁₇ F	190-2 Cu
KNO ₃	2.000	1.400	1.000
KCl	-	-	40.0
NH ₄ H ₂ PO ₄	380.0	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	200.0
NH ₄ NO ₃	-	300.0	-
KH ₂ PO ₄	-	400.0	300.0
Ca(NO ₃) ₂ x 4H ₂ O	-	-	100.0
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0.025	0.025	-
MgSO ₄ x 7H ₂ O	200.0	150.0	200.0
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0.005	-	-
NA ₂ EDTA	-	37.25	37.300
NA ₂ EDTA x 2H ₂ O	37.300	-	-
FeSO ₄ x 7H ₂ O	27.800	27.850	27.800
MnSO ₄ x 4H ₂ O	8.0	11.200	8.0
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	3.0	8.600	3.0
H ₃ BO ₃	3.0	6.200	3.0
KI	0.500	0.830	0.500
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0.025	0.025	0.500
CaCl ₂ x 2H ₂ O	140.0	150.0	-
K ₂ SO ₄	700.0	-	-
myo-Inositol	-	100.0	100.0
Thiamine HCl	2.000	1.000	1.0
Pyridoxine HCl	0.500	0.500	0.500
Nicotinic acid	-	0.500	0.500
Nicotonic acid	0.500	-	-
D-Biotin	-	1.500	-
2,4-D	2.0	2.000	-
Glycine	-	2.000	2.0
Sucrose	-	90.000	30.000
Maltose	80.000	-	-
Kinetin	0.500	0.500	0.500
Folic acid	-	0.500	-
NAA	-	-	0.500
Gelrite	-	-	2.800
Agar	6.000	5.500	-
pH	5.800	5.800	5.800

3.2 Yöntem

Çalışmada ele alınan buğday melezlerinde başak gelişimleri izlenmiş ve başaklardaki anterlerdeki çiçek tozları mikroskop altında incelenerek erken tek çekirdekli olduğu dönemde başaklar alınmış daha sonra W₁₄F başlangıç besi ortamı olarak kullanılarak aşağıda ayrıntıları verildiği şekilde anter kültürü yapılmıştır.

3.2.1. Anter kültürü uygulaması

Anter kültürü, çiçek tozu oluşumu sırasında anterlerin çiçek tomurcuklarından çıkarılıp steril koşullarda besi ortamına aktarılması ile başlar. Anterler bu kültür ortamında mitoz bölünme ile gelişirler. 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.

Anter kültürü çalışmasında kullanılan başlıca safhalar;

- Verici bitkinin seçilmesi,
- Çiçek tozu gelişimi,
- 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,
- Bitkilerde ploidi düzeyinin belirlenmesi,
- Haploid bitkilerde kromozom katlaması,
- Spontan double haploid bitkilerin iklime alıştırmaları,
- Bitkilerin saksılardan seraya aktarılması,
- Bitkilerin hasadı.

Bu safhalar alt başlıklar halinde tek tek açıklanmıştır.

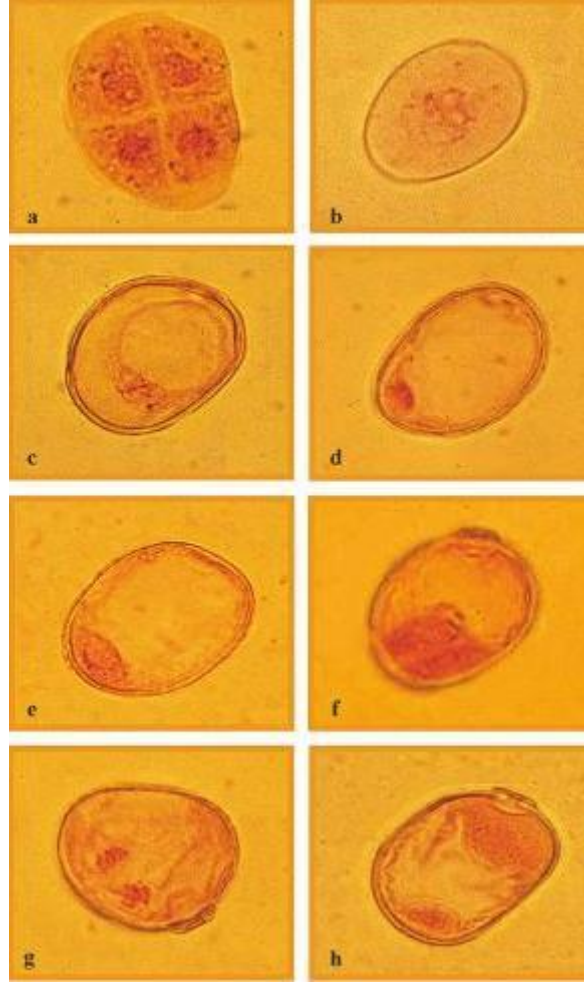
3.2.1.1. Verici (donör) bitkinin seçilmesi

Yapılan çalışmanın ilk aşamasını verici bitkilerin seçimi oluşturmaktadır. Verici bitkinin gücü ve yetiştirme koşulları anter kültürüne yanıtta oldukça etkilidir. Güçlü gelişen bitkiler zayıf gelişen bitkilerden daha yüksek yanıt vermektedirler. 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.

3.2.1.2. Çiçek tozu gelişim dönemi

In vitro da androgenesis üzerine etkili olan en önemli faktörlerden birisi de donör bitki üzerinden izole edildiği anda anterlerde bulunan çiçek tozlarının gelişme dönemidir.

Gelişen bitkilerin çiçek tozlarındaki gelişim dönemlerini belirlemek için tarlada gelişen bitkilerden tesadüfî olarak bitkiler seçilir. Bu bitkilerin başaklarından uç, orta ve alt kısımdan asetokarmin ile boyama için anterler alınır. Bu mikrosporlar bir lamel üzerinde asetokarmin ile boyanarak bir ışın mikroskobu altında incelenir. *In vitro* da androgenesis için optimum çiçek tozu gelişim dönemi erken tek çekirdekli gelişim dönemidir (Resim 3.1.) Çalışmamızda bu dönemdeki başaklar materyal olarak kullanılmıştır. Ayrıca çiçek tozu gelişiminin etkisini belirlemek için iki farklı dönemde çiçek tozunu içeren anterlerde çalışma yapılmıştır.



Resim 3.1 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 Uygulama

Çiçek tomurcuklarına yapılan bazı ön uygulamalar, mikrosporların kültür sırasındaki gelişmesi üzerine olumlu etki yapmaktadır. Anter kültüründe en etkili ön uygulama, tomurcuklara yapılan soğuk şoklardır. 4 – 10 °C'ler arasında, 72 saat ile 4 haftaya kadar tutulan tomurcuklar, polen rejenerasyonu bakımından olumlu yanıtlar vermiştir (Bajaj 1990).

Çalışmamızda başaklarda 2 farklı uygulama yapılmıştır. Deneme alanından başaklar alınmış ve erken tek çekirdekli fakat vakuol tam oluşmadığı dönemde çiçek tozları içeren başaklar anter kültüründe kullanılmıştır. Ayrıca çalışmada 3 melez popülasyonunda anterler

çiçek tozlarının gelişim dönemlerinin anter kültürü üzerine etkisini belirleme için iki farklı dönemde olan anterler alınmış ve anter kültürü uygulanmıştır.

- A. Başaklarda anterler erken tek çekirdekli dönemde ancak vakuol henüz tam oluşmamış.
- B. Başaklarda anterler erken tek çekirdekli dönemde ve vakuol oluşmuş.

3.2.1.4. Besi Ortamının Hazırlanması

Anter kültürü çalışmalarında kullanılan besi ortamları sıvı ya da katı olabilir. Sıvı ortam saf suda besleyicilerin çözülmesiyle hazırlanmıştır. Ancak hücrelerin hasar görmemesi için ortamın ozmotik potansiyelinin iyi ayarlanması (izotonik) gerekir. Bu amaçla çözeltiliye bir miktar sakkaroz 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. Katı ortamın hazırlanış aşamaları sıvı ortamlarla aynıdır. Ancak, ortamın hazırlanış tamamlandıktan sonra katılaştırmak amacıyla % 0.7- 1.3 arasında agar ilave edilmiştir.

3.2.1.5. Sterilizasyon

Henüz olgunlaşmamış ve içerisinde birinci çiçek tozu mitozu aşamasına gelmiş tek çekirdekli mikrosporları bulunduran anterler, anter kültürü için uygun başlangıç materyalidir (Resim 3.2.).

Çalışmamızda, soğuk odadan alınan başaklardan sap ve yapraklar uzaklaştırılmıştır (Resim 3.3.). Daha sonra başaklar, su + % 1-2 'lik sodyum hipoklorid ve birkaç damla damlatılmış Tween-20 bulunan solüsyonda 20 dakika süresince çalkalanmıştır (Resim 3.4.). Daha sonra bu başaklar steril kabin içerisinde 3-4 defa steril su ile yıkanmış ve steril kaplar içine transfer edilmiştir.

Anterlerin başakçık içerisinden çıkarılması sırasında ezilmemesine ve filamentlerinin, anterle birleştiği noktadan kesilerek uzaklaştırılmasına dikkat edilmiştir.



Resim 3.2. Ön soğuk uygulaması yapılmış ve sterilizasyona hazır başaklar (orjinal)



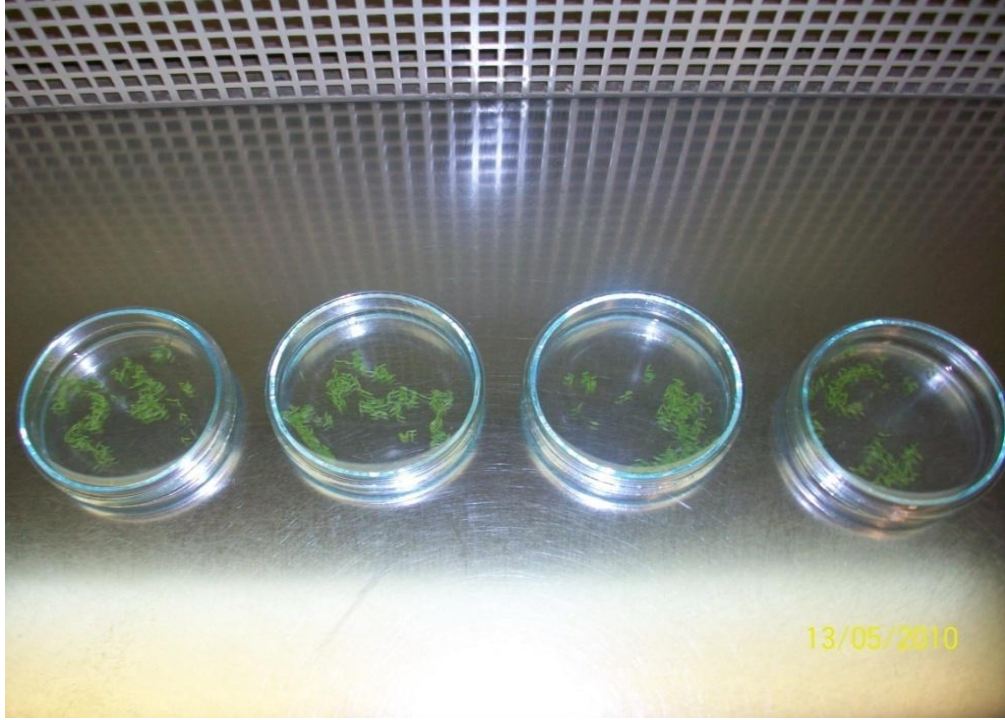
Resim 3.3. Buğday başaklarında sterilizasyon öncesi yaprak ve kılçıkların uzaklaştırılması (orjinal)



Resim 3.4. Başakların % 2 lik sodyum hipokloridle sterilizasyonu (orjinal)

3.2.1.6. Anterlerin Besi Ortamına Aktarılması

Sterilizasyon işleminden sonra steril hale getirilen başaklardan anterler, yine steril kabin altında steril penslerle alınarak daha önce hazırlanmış olan besi ortamı üzerine aktarılmıştır (Resim 3.5.). Çalışmamızda anter kültüründe yanıt üzerine başlangıç besi ortamının etkisini belirlemek için iki farklı besi ortamı kullanılmıştır ($W_{14}F$ ve $C_{17}F$). Bu amaçla hazırlanan sıvı besi ortamlarına anterler aktarılmıştır. Her petri kabına 15'er ml besi ortamı konmuş ve her genotipten 4 petri kabı tekrarlama olarak kullanılmıştır. Her buğday genotipinden hazırlanan 4 petri kabına her petri kabında 150 adet anter olmak üzere 600 anter aktarılmıştır.



Resim 3.5. Başlangıç ortamına aktarılan anterler (orjinal)

3.2.1.7. Anterlerin inkübasyonu

Petri kaplarına aktarılan anterler 32°C'de karanlık inkübatörde 3 gün bırakılmış (Resim 3.6.), daha sonra 28°C'de inkübatöre alınmıştır (Resim 3.7.). Bu aşamadan sonra gelişme iki farklı doğrultuda olabilir; birincisi, anterlerden ya doğrudan embriyo oluşumu gerçekleşmekte ve 6-8 hafta içerisinde toprağa transfer edilebilecek gelişme düzeyine ulaşmış bitkiler elde edilebilmekte, ikincisi ise, haploid kallus dokusu oluşmakta ve kallustan bitki rejenerasyonu yoluna gidilebilmektedir. Bunlardan ilkinde direkt androgenesis ikincisine ise indirekt androgenesis denir.

Çalışmamızda 4-5 hafta süresince anterlerden kallus gelişimi yani indirekt androgenesis şeklinde gelişim olmuştur ve bunlar üzerinde gerekli işlemler yapılmıştır.



Resim 3.6. Anterlerin 3 gün süre ile 32 °C’de inkübatörde bırakılması (orjinal)



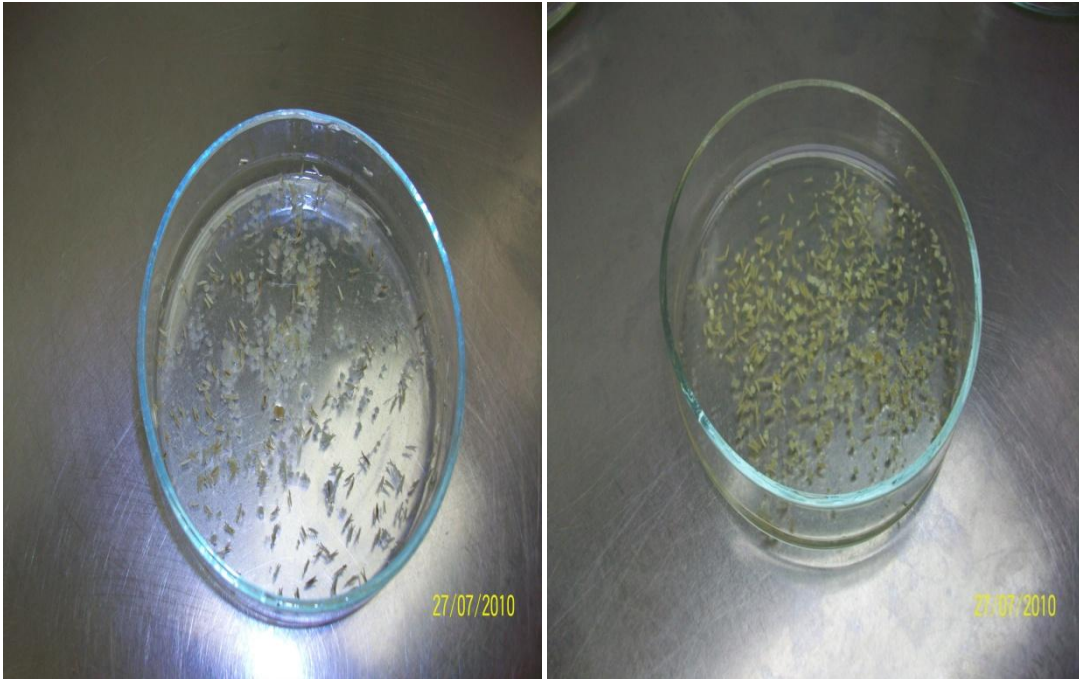
Resim 3.7. Anterlerin inkübatörde 28 °C’de bırakılması (orjinal)

3.2.1.8. Kallusların Gelişimi ve Rejenerasyon Ortamına Aktarılması

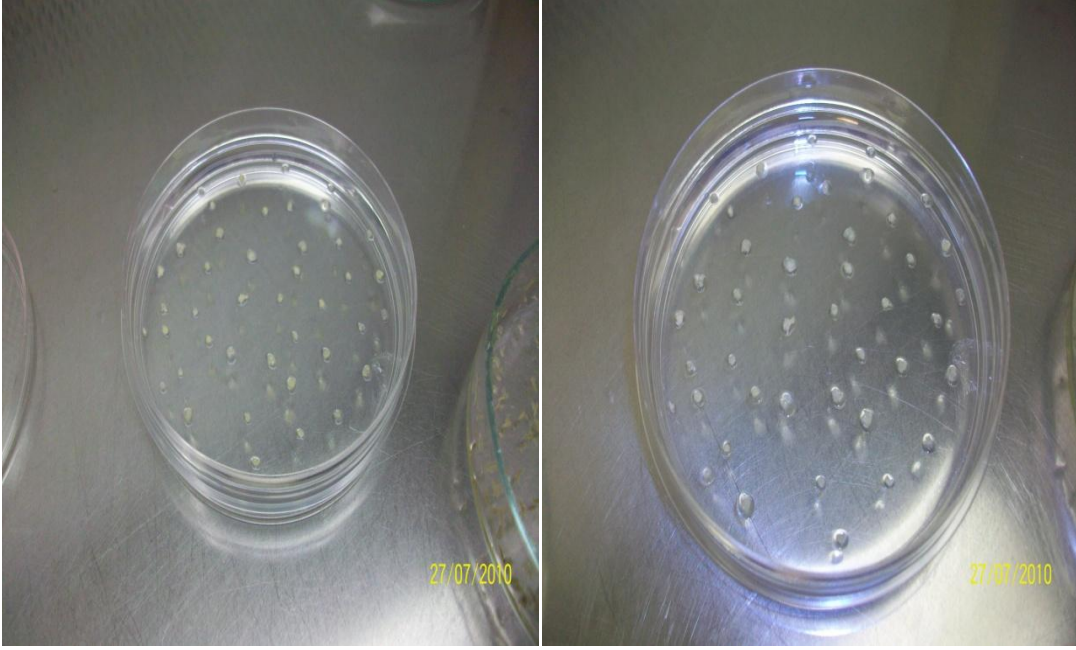
Kallus, sağlıklı bitki hücrelerinin bölünmesi ile meydana gelen, organize olmamış şekilsiz dokulardan oluşan hücre topluluklarıdır.

Bitki türlerine göre değişen sürelerde, genellikle 4-5 haftadan sonra anterlerden kallus gelişimi gözlenmiştir (Resim 3.8.) ve bu anterlerden gelişen kalluslar 1-2 cm çapına ulaştıktan sonra hazırlanan katı 190-2 Cu besi ortamı üzerine aktarılmışlardır (Resim 3.9.). Genotiplerin geliştirdiği kallus sayısına göre petri kabı kullanılmış, her genotipten kallus gelişim durumuna göre 2-3 kez kallus aktarımı yapılmıştır.

Bu kallusların bulunduğu kaplar 8 saat ışık altında ($50 \text{ } \mu\text{mol s}^{-1} \text{ m}^{-2}$) % 50 nemin bulunduğu iklim odalarında $28 \text{ } ^\circ\text{C}$ 'de tutulmuştur.



Resim 3.8. Elde edilen kalluslar (orjinal)



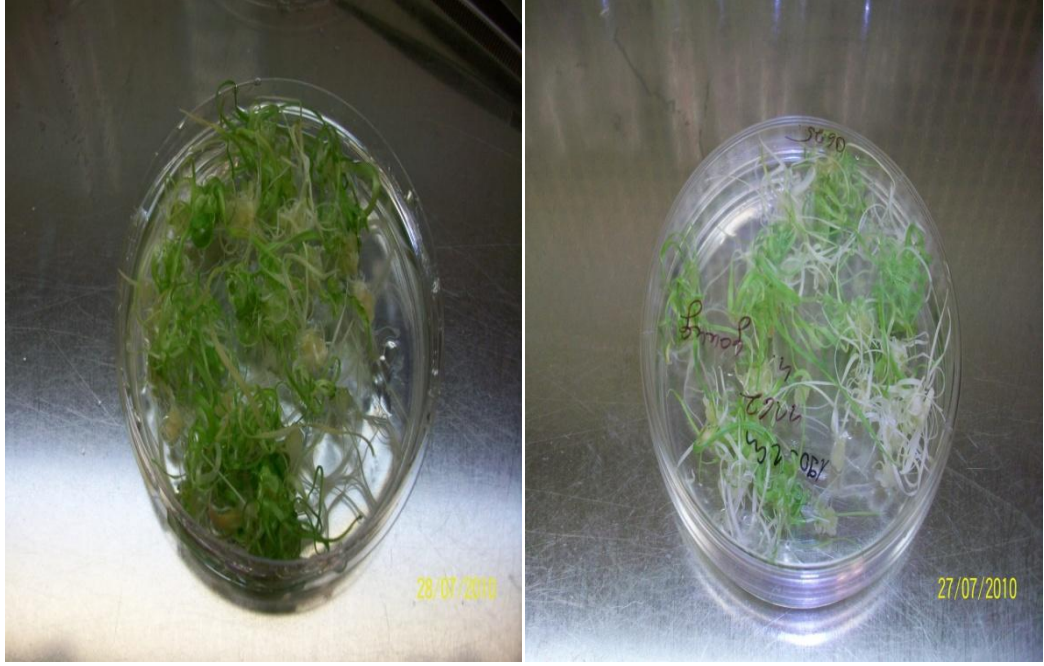
Resim 3.9. Yeni besi ortamına aktarılmış kalluslar (orjinal)

3.2.1.9 Kalluslardan Gelişen Albino ve Yeşil Bitkicik Sayılarının Belirlenmesi ve Test Tüplerine Aktarılması

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.(Resim 3.10.).

Bu petri kaplarında gelişen yeşil bitkicikler, belirli bir gelişimi gösterince hazırlanmış olan test tüplerine (içinde yine taze 190-2 Cu bulunan) aktarılıp (Resim 3.11.), tekrar iklim odasına gönderilmiştir (Resim 3.12.).

Rejenerasyon ortamının içeriği bitki büyüme düzenleyicileri dışında aynıdır ve sakaroz oranı % 1.5 azaltılmıştır. Albino bitkicikler ise gerekli sayımları yapıldıktan sonra atılmıştır.



Resim 3.10. Katı besi ortamına aktarılan yeşil bitkicikler (orjinal)



Resim 3.11. Gelişen yeşil bitkiciklerin test tüplerine aktarımı (orjinal)



Resim 3.12. Test tüplerine aktarılmış yeşil bitkicikler (orjinal)

3.2.1.10. Test Tüplerinde Gelişen Bitkilerin Toprak Bulunan Küçük Tüplere Aktarımı ve Vernalizasyon Yapılması

Bu test tüplerinde yeterli sürgün ve kök gelişimini gösteren bitkiler özel kompost toprağı içeren küçük plastik saksılara aktarılmıştır (Resim 3.13.). Dış ortama alışmaları için 3-4 gün süresince üzerlerine naylon torbalar geçirilmiş ve iklime alıştırma yapılmıştır (Resim 3.14.). Bitkilerden vernalizasyon ihtiyacı olanlar soğuk odada (2-4 °C de, 16 saat 62.5 mikromol m⁻² s⁻¹ ışık yoğunluğunda) 5-6 hafta süresince bırakılmıştır (Resim 3.15.).



Resim 3.13. Test tüplerinde gelişen bitkiciklerin küçük saksılara aktarımı (orjinal)



Resim 3.14. Bitkilerde iklime alıştıırma (orjinal)



Resim 3.15. Vernalizasyon ihtiyacı olan bitkilerin soğuk odada tutulması (orjinal)

3.2.1.11. Bitkilerde Ploidi Düzeyinin Belirlenmesi

Bitkilerde ploidi düzeyi farklı yöntemler kullanılarak belirlenmektedir.

Fenotipik olarak: Haploid bitkiler steril kısa ve dar yapraklı çok sayıda haploid küçük salkım ve küçük başakçıklara sahip oldukları gözlenmiştir (Resim 3.16.).



Resim 3.16. Fenotipik olarak haploid (önde) ve double haploid bitkiler (arkada) (orjinal)

Stoma hücrelerine bakılarak: Değişik bitki türlerinde stomaların büyüklüğü ile ploidi düzeyi arasında önemli ilişkiler belirlenmiştir. Haploid bitkilerin stomalarının double haploidlerinkine 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 3.17.).



Resim 3.17. Stoma hücrelerine bakarak ploidi düzeyinin belirlenmesi (orjinal)

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 flow sitometri, hücrelerin tek tek floresan dedektörden geçerken emdikleri ışının analizine dayanan bir yöntemdir.

3.2.1.12. Haploid Bitkilerde Kromozom Katlaması

Haploid bitki eldesinde kromozom katlaması başlangıç ortamına ilave edilen colchisin ile elde edilebileceği gibi, elde edilen bitkiciklerde de kromozom katlaması işlemi yapılabilmektedir. Elde edilen haploid bitkilerde kromozom katlaması aşağıdaki gibi yapılmıştır.

- 1) Geliştirilen bitkiler serada uygun bir ortama alınmıştır. Bu bitkiler, saksılardan sökülerek toprakları yıkanmıştır. Bitkilerin kökleri 1 cm kalacak şekilde ve kesilen kökün besleyebileceği oranda üst kısmından da yapraklardan belirli oranda kesilmiştir (Resim 3.18.).



Resim 3.18. Bitkilerin köklerinin kısaltılması (orjinal)

- 2) Bu bitkilerin kökleri % 0,1 colchisin +% 2 DMSO + su solüsyonunda 4-5 saat bırakılmıştır. Burada bitkilerin kökleri sıvıya daldırılarak solüsyonda bekletilmiştir.



Resim 3.19. Kısaltılan bitki köklerinin hazırlanan solüsyonda bekletilmesi (orjinal)

- 3) Daha sonra bitkiler solüsyondan alınarak akan çeşme suyu altında yıkanmıştır (Resim 3.20.).



Resim 3.20. Bitkilerin akan çeşme suyu altında yıkanması (orjinal)

- 4) Kökleri yıkanan bitkiler tekrar seradaki saksılarda toprağa aktarılmıştır. Bitkilerin toprağa daha iyi tutunması için birkaç gün nemli ortamda tutulmuştur. Böylece, bitkilerin dış ortam koşullarına daha uyumlu olması sağlanmıştır (Resim 3.21.).



Resim 3.21. Bitkilerin tekrar toprağa aktarılması (orjinal)

- 5) Saksılardaki bitkiler belirli bir gelişim süresinden sonra daha büyük plastik torbalara aktarılmıştır. Hasada kadar seraya transfer edilmiş ve daha sonra gerekli bakım ve gözlem işlemleri yapılmıştır.

3.2.1.13. Bitkilerin Seraya Aktarılması

Soğuk odada gelişen bitkiler daha sonra içinde 1/3 kompost bulunan plastik torbalara (yaklaşık 1 l'lik) aktarılmıştır ve üzerine etiket bilgileri yazılmıştır (Resim 3.22.). Bu bitkilerde gerekli sulama ve gübreleme işlemleri yapılmıştır.



Resim 3.22. Serada yetişen bitkiler (orjinal)

3.2.1.14. Bitkilerin Hasat Edilmesi

Çalışma sonunda topraklı ortama aktarılan bitkiler gerekli kültürel bakım işleri yapılarak hasada kadar serada gelişmiş, hasatta her bitki ayrı ayrı hasat ve harman yapılmıştır (Resim 3.23.). Bu bitkilerden hasat edilen tohumlar ayrı ayrı paketlenerek gelecek yıl için ekime hazırlanmıştır.



Resim 3.23. Hasat zamanında double haploid (a) ve haploid bitkiler (b) (orjinal)

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Araştırma, buğday melezlerinde iki farklı başlangıç ortamı, iki farklı çiçek tozu gelişim dönemi ve farklı melez buğday popülasyonlarının anter kültüründe yanıt üzerine etkilerinin ortaya konması amacıyla yürütülmüştür. Buğdayda mevcut sorunların çözümü yönünden doku kültürü tekniğinin önemli bir yöntem olduğu belirtilmiştir (Özgen ve Akar 1993).

Bu amaçla 4'ü makarnalık olmak üzere 19 buğday melezi kullanılmıştır. 4 makarnalık buğday melezinde iki farklı başlangıç besi ortamı incelenmiştir. 3 ekmeklik melezin, erken tek çekirdekli dönemde, vakuol oluşmuş ve vakuol oluşmamış dönemlerine göre anter kültürüne yanıtları belirlenmiştir. Ayrıca 12 buğday melezinde ise anter kültürüne yanıt incelenmiştir. Anterlerden gelişen, kallus, albino bitkicik, yeşil bitkicik sayısı ve seraya aktarılan bitki sayıları belirlenmiştir. Elde edilen veriler Çizelge 4.1, 4.2 ve 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.1. Dört makarnalık buğday çeşidinin iki farklı besi ortamında anter kültürüne yanıtları

Melez popülasyon	Besi ortamı	Kallus	Albino bitki	Yeşil bitki	Toprağa aktarılan yeşil bitki
Svevo/Zenit					
	W ₁₄ F	8	-	-	-
	W ₁₄ F	11	-	1	1
	W ₁₄ F	4	-	2	2
	W ₁₄ F	7	-	0	0
	C ₁₇ F	9	-	-	-
	C ₁₇ F	13	-	-	-
	C ₁₇ F	9	-	-	-
Gediz 75/Yavaros 79//IDSN 209					
	W ₁₄ F	14	2	0	-
	W ₁₄ F	35	5	1	1
	W ₁₄ F	11	4	-	-
	W ₁₄ F	13	-	-	-
	C ₁₇ F	16	1	-	-
	C ₁₇ F	36	-	-	-
	C ₁₇ F	29	1	-	-
	C ₁₇ F	17	-	-	-
Fuatbey/Zenit					
	W ₁₄ F	30	6	3	3
	W ₁₄ F	9	-	-	-
	W ₁₄ F	10	6	-	-
	W ₁₄ F	9	1	-	-
	C ₁₇ F	10	3	6	2

	C ₁₇ F	8	6	-	-
	C ₁₇ F	3	-	-	-
	C ₁₇ F	4	-	-	-
Svevo/ IDSN 165					
	W ₁₄ F	4	1	-	-
	W ₁₄ F	14	1	-	-
	W ₁₄ F	9	-	-	-
	W ₁₄ F	15	-	-	-
	C ₁₇ F	23	1	-	-
	C ₁₇ F	23	-	-	-
	C ₁₇ F	22	-	-	-
	C ₁₇ F	12	1	-	-

Çizelge 4.2. Üç ekmeklik buğday melezinin iki farklı çiçek tozu gelişim döneminde anter kültürüne yanıtları

Melez popülasyon	Çiçek tozu gelişim dönemi	Kallus	Albino bitki	Yeşil bitki	Toprağa aktarılan yeşil bitki
Krasunia/Sana					
	A	330	55	31	29
	A	314	48	34	32
	A	295	68	44	43
	A	371	108	29	27
	B	292	94	14	9
	B	120	59	14	13
	B	290	59	7	7
	B	362	62	7	6
Pehlivan/F 85					
	A	63	6	10	10
	A	14	3	9	8
	A	39	9	8	5
	A	59	5	7	7
	B	63	14	11	7
	B	40	7	4	4
	B	89	11	16	10
	B	42	10	8	7
F 85/Pehlivan					
	A	52	5	2	2
	A	25	6	3	2
	A	18	6	2	2
	A	31	5	5	4
	B	23	5	16	16
	B	36	5	25	21
	B	26	1	14	12
	B	28	4	10	8

A. Başaklarda anterler erken tek çekirdekli dönem vakuol henüz tam oluşmamış

B. Başaklarda anterler erken tek çekirdekli dönemde ve vakuol oluşmuş

Çizelge 4.3. Oniki ekmeklik buğday melezinin anter kültürüne yanıtları

Melez popülasyon	Besi Ortamı	Kallus	Albino bitki	Yeşil bitki	Toprağa aktarılan yeşil bitki
Sana/Krasunia					
	W ₁₄ F	28	-	2	2
	W ₁₄ F	8	-	-	-
	W ₁₄ F	22	1	-	1
	W ₁₄ F	17	-	-	-
Golia/Syrena					
	W ₁₄ F	192	30	81	67
	W ₁₄ F	317	29	82	69
	W ₁₄ F	242	17	82	70
	W ₁₄ F	72	14	37	31
Pehlivan/Sana					
	W ₁₄ F	308	34	0	0
	W ₁₄ F	172	31	3	1
	W ₁₄ F	334	65	6	6
	W ₁₄ F	114	45	7	5
Sadova/Sana					
	W ₁₄ F	219	36	0	0
	W ₁₄ F	93	36	4	4
	W ₁₄ F	160	23	3	2
	W ₁₄ F	199	34	5	4
F 85/Sana					
	W ₁₄ F	154	37	0	-
	W ₁₄ F	126	32	1	1
	W ₁₄ F	180	59	5	1
	W ₁₄ F	109	35	1	-
Syrena/Krasunia					
	W ₁₄ F	219	48	2	1
	W ₁₄ F	348	72	15	13
	W ₁₄ F	130	21	5	1
	W ₁₄ F	130	16	2	2
Pehlivan/Sadova					
	W ₁₄ F	42	5	6	6
	W ₁₄ F	60	6	5	3
	W ₁₄ F	31	1	3	1
	W ₁₄ F	36	6	9	7
F 85/Golia					
	W ₁₄ F	72	33	8	8
	W ₁₄ F	236	49	25	24
	W ₁₄ F	254	63	13	6
	W ₁₄ F	243	101	10	9
Syrena/Pehlivan					
	W ₁₄ F	69	10	22	21
	W ₁₄ F	69	14	25	24

	W ₁₄ F	65	11	26	25
	W ₁₄ F	81	33	27	23
Sadova/Pehlivan					
	W ₁₄ F	33	4	7	6
	W ₁₄ F	32	4	8	6
	W ₁₄ F	24	0	4	2
	W ₁₄ F	16	14	6	5
Pehlivan/Bezostaja 1					
	W ₁₄ F	23	10	1	1
	W ₁₄ F	29	7	3	2
	W ₁₄ F	3	1	1	1
	W ₁₄ F	22	3	1	1
Krasunia/Syrena					
	W ₁₄ F	59	9	3	3
	W ₁₄ F	33	6	4	1
	W ₁₄ F	16	5	4	3
	W ₁₄ F	23	4	2	2

4.1. Besi ortamı

4.1.1. Kallus sayısı

Dört makarnalık buğday F₃ popülasyonunda farklı besi ortamının etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada elde edilen kallus sayılarında varyans analizi yapılmış, analiz sonuçları Çizelge 4.4’de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Dört makarnalık buğday F₃ popülasyonunda farklı besi ortamlarında elde edilen kallus sayıları için varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik derecesi	Kareler Ortalaması	F hesap	F çizelge	
				0.05	0.01
Melez popülasyon	3	257.708	3.499*	3.490	5.950
Hata ₁	12	73.646			
Besi ortamı	1	50.000	1.820	4.750	9.330
Melez popülasyon x Besi ortamı int.	3	119.083	4.334*	3.490	5.950
Hata ₂	12	27.479			
Genel	31	77.222			

*) ortalamalar arasındaki farklılık 0.05 düzeyinde istatistik olarak önemlidir.

***) ortalamalar arasındaki farklılık 0.01 düzeyinde istatistik olarak önemlidir

Yapılan varyans analizi sonucunda incelenen çeşitlerin kallus sayıları arasındaki farklılıklar istatistik olarak 0.05 düzeyinde bulunurken, uygulanan iki farklı başlangıç ortamının etkisi ise istatistik olarak önemsiz bulunmuştur. Melez popülasyonlarının besi

ortamlarına tepkileri olan melez popülasyon x besi ortamı interaksiyonu ise istatistik olarak 0.05 düzeyinde önemli bulunmuştur. Buradan; melez popülasyonlarının besi ortamında kallus oluşturma oranlarında farklılık olduğu anlaşılmaktadır. İstatistik olarak önemli bulunan ortalamalar arasındaki farklılıkları ortaya koymak için EKÖF testi yapılmış ve sonuçları Çizelge 4.5’de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Dört makarnalık buğday F₃ popülasyonunda farklı besi ortamında elde edilen kallus sayısında önemlilik grupları

Melez popülasyon	Kallus sayısı	Melez popülasyon x Besi ortamı int.	Kallus sayısı
Gediz75/Yavaros 79//IDSN 209	21.375 a	Ged/Yav//IDSN 209 x C ₁₇ F	24.500 a
Svevo/IDSN 165	15.250 ab	Svevo/Zenit x C ₁₇ F	20.000 ab
Fuatbey/Zenit	10.375 b	Ged/Yav//IDSN 209 x W ₁₄ F	18.250 abc
Svevo/Zenit	8.750 b	Sana/Krasunia x W ₁₄ F	14.500 bcd
Besi Ortamları	Kallus sayısı	Svevo/IDSN 65 x W ₁₄ F	10.500 cde
		Svevo/Zenit x W ₁₄ F	10.000 de
C ₁₇ F	15.188	Svevo/IDSN 65 x W ₁₄ F	7.500 de
W ₁₄ F	12.688	Fuatbey/Zenit x C ₁₇ F	6.250 e
EKÖF (0.05)	9.35	EKÖF (0.05)	9.35

Yapılan önemlilik testi sonucunda, melez popülasyonlar arasında iki farklı grup olduğu görülmüştür. En yüksek kallus sayısı 21.38 adet ile Gediz 75/Yavaros 79//IDSN 209 adlı genotipte elde edilirken, bunu 15.25 adet kallus sayısı ile Svevo/IDSN 165 melez popülasyonu izlemiştir. En düşük kallus sayısı ise 8.70 adet ile Svevo/Zenit melez popülasyonunda olmuş, bunu 10.38 adet ile Fuatbey/Zenit melez popülasyonu izlemiştir. Besi ortamları arasındaki farklılık istatistik olarak önemsiz bulunmuştur. En yüksek kallus sayısı 15.19 adet ile C₁₇F besi ortamında elde edilirken, W₁₄F besi ortamında ise 12.69 adet kallus elde edilmiştir. Değişik araştırmacılar yaptıkları çalışmada başlangıç besi ortamının anter kültürüne yanıtta önemli düzeyde etkili olduğunu belirtmişlerdir.

Melez popülasyonların besi ortamlarına tepkileri gözden geçirildiğinde, en yüksek kallus sayısı 24.50 adet ile Gediz 75/Yavaros 79//IDSN 209 ile C₁₇F besi ortamında elde edilmiştir. Bu çeşidi 20.00 adet kallus sayısı ile Svevo/Zenit C₁₇F besi ortamındaki kallus sayısı izlemiştir. Gediz 75/Yavaros 79//IDSN 209 melez popülasyonu W₁₄F besi ortamında 18.25 adet kallus sayısı ile üçüncü sırada yer almıştır. En düşük kallus sayısı ise

Fuatbey/Zenit melez popülasyonunun C₁₇F besi ortamındaki 6.25 adet kallus vermesi ile olmuş, bunu Svevo/IDSN 165 melez popülasyonunun W₁₄F besi ortamındaki 7.50 adet kallus sayısı izlemiştir.

4.1.2. Albino bitkicik sayısı

Dört makarnalık buğday F₃ popülasyonunda farklı besi ortamının etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan bu çalışmada elde edilen albino bitkicik sayılarında varyans analizi yapılmıştır. Yapılan varyans analizi sonucunda incelenen çeşitlerin albino bitkicik sayıları arasındaki farklılıklar istatistik olarak 0.05 düzeyinde önemli bulunurken, uygulanan iki farklı başlangıç ortamının etkisi ise istatistik olarak önemsiz bulunmuştur. Melez popülasyonlarının besi ortamlarına tepkileri ise istatistik olarak önemsiz bulunmuştur. Bu da melezlerin besi ortamında albino bitkicik oluşturma oranlarında farklılığın istatistik olarak önemli olmadığını göstermektedir. İstatistik olarak önemli bulunan ortalamalar arasındaki farklılıkları ortaya koymak için EKÖF testi yapılmış ve sonuçları Çizelge 4.6’da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Dört makarnalık buğday F₃ popülasyonunda farklı besi ortamında elde edilen albino bitkicik sayısında önemlilik grupları

Melez popülasyon	Kallus sayısı	Melez popülasyon x Besi ortamı int.	Kallus sayısı
Fuatbey/Zenit	4.400 a	Fuatbey/Zenit x C ₁₇ F	4.50
Gediz75/Yavaros79//IDSN 209	2.600 ab	Fuatbey/Zenit x W ₁₄ F	4.33
Svevo/Zenit	1.000 b	Gediz75/Yavaros79//IDSN 209 x W ₁₄ F	3.67
Svevo/IDSN 165	1.000 b	Svevo/Zenit x W ₁₄ F	1.00
Besi ortamı	Kallus sayısı	Svevo/Zenit x C ₁₇ F	1.00
		Gediz75/Yavaros79//IDSN 209 x C ₁₇ F	1.00
W ₁₄ F	2.636	Svevo/IDSN 165 x W ₁₄ F	1.00
C ₁₇ F	1.875	Svevo/IDSN 165 x C ₁₇ F	1.00
EKÖF (0.05)	2.219	EKÖF (0.05)	

Yapılan önemlilik testi sonucunda melez popülasyonlar arasında iki farklı grup oluşmuştur. En yüksek albino bitkicik sayısı 4.40 adet ile Fuatbey/Zenit melez popülasyonunda elde edilirken, bunu 2.60 adet albino bitkicik sayısı ile Gediz 75/Yavaros 79//IDSN 209 melez popülasyonu izlemiştir. Svevo/Zenit ve Svevo/IDSN 165 melez popülasyonunda ise aynı sayıda kallus oluşmuştur. Denemeye alınan iki farklı başlangıç besi

ortamları arasındaki farklılık istatistik olarak önemsiz bulunmuştur. En yüksek albino bitkicik sayısı 2.64 adet ile $W_{14}F$ besi ortamında elde edilirken, $C_{17}F$ besi ortamında ise 1.90 adet albino bitkicik elde edilmiştir.

Melez popülasyonlarının besi ortamlarına tepkileri gösteren melez popülasyon x besi ortamı interaksiyonu da önemsiz bulunmuştur. En yüksek albino bitkicik sayısı 4.50 adet ile Fuatbey/Zenit çeşidinde ve $C_{17}F$ besi ortamında elde edilmiştir. Bunu 4.33 adet albino bitkicik sayısı ile yine Fuatbey/Zenit melezinin $W_{14}F$ besi ortamındaki albino bitkicik sayısı izlemiştir. Gediz 75/Yavaros 79//IDSN 209 melez popülasyonu $W_{14}F$ besi ortamında 3.67 adet albino bitkicik sayısı ile üçüncü sırada yer almıştır. Svevo/Zenit ve Fuatbey/Zenit melezlerinin iki besi ortamındaki kallus sayıları ve Gediz 75/Yavaros 79//IDSN 209'un $C_{17}F$ numaralı besi ortamındaki kallus sayıları 1.00 ile aynı değerleri vermişlerdir.

4.1.3. Yeşil bitkicik sayısı

Dört makarnalık buğday F_3 popülasyonunda farklı besi ortamının yeşil bitkicik sayısına etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada elde edilen yeşil bitkicik sayılarında varyans analizi yapılmıştır.

Yapılan varyans analizi sonucunda incelenen melezlerin yeşil bitkicik sayıları arasındaki farklılık, uygulanan iki farklı başlangıç ortamının etkisi ve çeşitlerin besi ortamlarına tepkileri olan melez popülasyon x besi ortamı interaksiyonu istatistik olarak önemsiz bulunmuştur. Bu da çeşitlerin besi ortamında kallus oluşturma oranlarında farklılık olmadığını göstermektedir. Bu dört makarnalık buğday F_3 popülasyonunda farklı besi ortamında elde edilen yeşil bitkicik sayıları Çizelge 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Dört makarnalık buğday F_3 popülasyonunda farklı besi ortamında elde edilen yeşil bitkicik sayıları

Melez popülasyon	Kallus sayısı	Melez popülasyon x Besi ortamı int.	Kallus sayısı
Fuatbey/Zenit	1.714	Fuatbey/Zenit x $C_{17}F$	2.00
Svevo/Zenit	0.917	Svevo/Zenit x $W_{14}F$	1.50
Gediz75/Yavaros79//IDSN 209	0.667	Fuatbey/Zenit x $W_{14}F$	1.33
Svevo/IDSN 165	0.000	Gediz75/Yavaros79//IDSN209 x $W_{14}F$	0.67
Besi ortamı	Kallus sayısı	Gediz75/Yavaros79//IDSN 209 x $C_{17}F$	0.67
		Svevo/Zenit x $C_{17}F$	0.62
$C_{17}F$	1.136	Svevo/IDSN 165 x $W_{14}F$	0.00
$W_{14}F$	1.125	Svevo/IDSN 165 x $C_{17}F$	0.00

Denemeye alınan çeşitler arasında en yüksek ortalama yeşil bitkicik sayısı 1.71 adet ile Fuatbey/Zenit genotipinde elde edilirken, bunu 0.92 adet yeşil bitkicik sayısı ile Svevo/Zenit melez popülasyonu izlemiştir. En düşük değer ise hiç yeşil bitkicik elde edilemeyen Svevo/IDSN 165 melez popülasyonunda olmuştur. Besi ortamları arasındaki farklılık istatistik olarak önemsiz bulunmuştur. En yüksek yeşil bitkicik sayısı 1.14 adet ile C₁₇F besi ortamında elde edilirken, W₁₄F besi ortamında ise 1.12 adet yeşil bitkicik elde edilmiştir.

Melez popülasyonların besi ortamlarına tepkileri gözden geçirildiğinde, en yüksek yeşil bitkicik sayısı 2.00 adet ile Fuatbey/Zenit melezinden C₁₇F besi ortamında elde edilmiştir. Bu çeşidi 1.50 adet yeşil bitkicik sayısı ile Svevo/Zenit melezinin W₁₄F besi ortamındaki yeşil bitkicik sayısı izlemiştir. Fuatbey/Zenit melez popülasyonu W₁₄F besi ortamında 1.33 adet yeşil bitkicik sayısı ile üçüncü sırada yer almıştır. Svevo/IDSN 165 melezin W₁₄F ve C₁₇F besi ortamlarında yeşil bitkicik elde edilememiştir. Anter kültürü üzerine farklı başlangıç ortamının etkisini araştıran araştırmacılar besi ortamına göre farklı oranda kallus, albino ve yeşil bitkicik elde edildiğini bulmuşlardır (Moieni ve ark. 1997, Orshinsky ve Sadasivaiah 1994, Pauk ve ark. 2003).

4.1.4. Seraya aktarılan bitki sayısı

Dört makarnalık buğday F₃ popülasyonunda farklı besi ortamının etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada elde edilen seraya aktarılan bitki sayılarında varyans analizi yapılmıştır.

Yapılan varyans analizi sonucunda incelenen melez popülasyonlarının seraya aktarılan bitki sayıları arasındaki farklılık, uygulanan iki farklı başlangıç ortamının etkisi ve melez popülasyonlarının besi ortamlarına tepkileri olan melez popülasyon x besi ortamı interaksyonu istatistik olarak önemsiz bulunmuştur. Buda çeşitlerin besi ortamında seraya aktarılan bitki sayısı oluşturma oranlarında farklılık olmadığını göstermektedir. Çalışmada elde edilen ortalama değerler Çizelge 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Dört makarnalık buğday F₃ popülasyonunda farklı besi ortamında elde edilen seraya aktarılan bitki sayısı

Melez popülasyon	Kallus sayısı	Melez popülasyon x Besi ortamı int.	Kallus sayısı
Fuatbey/Zenit	1.143	Svevo/Zenit x W ₁₄ F	1.50
Svevo/Zenit	0.917	Fuatbey/Zenit x W ₁₄ F	1.33
Gediz75/Yavaros79//IDSN 209	0.667	Fuatbey/Zenit x C ₁₇ F	1.00
Svevo/IDSN 165	0.000	Gediz75/Yavaros79//IDSN 209 x W ₁₄ F	0.67
Besi ortamı	Kallus sayısı	Gediz75/Yavaros79//IDSN 209 x C ₁₇ F	0.67
		Svevo/Zenit x C ₁₇ F	0.62
W ₁₄ F	1.125	Svevo/IDSN 165 x W ₁₄ F	0.00
C ₁₇ F	0.773	Svevo/IDSN 165 x C ₁₇ F	0.00

Denemeye alınana melez popülasyonları arasında en yüksek seraya aktarılan bitki sayısı 1.14 adet ile Fuatbey/Zenit genotipinde elde edilirken, bunu 0.92 adet kallus sayısı ile Svevo/Zenit melez popülasyonu izlemiştir. En düşük seraya aktarılan bitki sayısı ise hiç bitki elde edilemeyen Svevo/IDSN 165 melez popülasyonunda olmuştur. Besi ortamları arasındaki farklılık istatistik olarak önemsiz bulunmuştur. En yüksek seraya aktarılan bitki sayısı 1.13 adet ile W₁₄F besi ortamında elde edilirken, C₁₇F besi ortamında ise 0.77 adet seraya aktarılan bitki sayısı elde edilmiştir.

Melez popülasyonlarının besi ortamlarına tepkileri gözden geçirildiğinde, en yüksek seraya aktarılan bitki sayısı 1.50 adet ile Svevo/Zenit melez popülasyonunun W₁₄F besi ortamında elde edilmiştir. Bu melezi 1.33 adet kallus sayısı ile Fuatbey/Zenit melezinin W₁₄F besi ortamındaki seraya aktarılan bitki sayısı izlemiştir. Fuatbey/Zenit melez popülasyonunun C₁₇F besi ortamı 1.33 adet seraya aktarılan bitki sayısı ile üçüncü sırada yer almıştır. Svevo/IDSN 165 melezinin W₁₄F ve C₁₇F besi ortamlarında ise hiç bitki elde edilememiştir. Anter kültüründe besi ortamının yanıt üzerine önemli etki yaptığı belirtilmiştir (Korkut 2009, Sarier 2010).

4.2. Çiçek tozu gelişim dönemi

4.2.1.Kallus sayısı

Üç ekmeklik buğday F₃ popülasyonunda farklı çiçek tozu gelişim döneminin anter kültürüne etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada elde edilen kallus sayılarında varyans analizi yapılmış, analiz sonuçları Çizelge 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Üç ekmeklik buğday F₃ popülasyonunda farklı besi ortamında elde edilen kallus sayıları için varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik derecesi	Kareler Ortalaması	F hesap	F çizelge	
				0.05	0.01
Melez popülasyon	2	176007.292	63.586**	4.260	8.020
Hata-1	9	2768.028			
Çiçek tozu gelişimi	1	1666.667	1.085	5.120	10.560
Melez popülasyon x Çiçek tozu int.	2	3177.042	2.069	4.260	8.020
Hata-2	9	1535.806			
Genel	23	17337.819			

Yapılan varyans analizi sonucunda incelenen çeşitlerin kallus sayıları arasındaki farklılıklar istatistik olarak 0.01 düzeyinde önemli bulunurken, uygulanan iki farklı başlangıç ortamının etkisi ise istatistik olarak önemsiz bulunmuştur. Melez popülasyonlarının çiçek tozuna tepkileri olan melez popülasyon x çiçek tozu interaksyonunu ise istatistik olarak önemsiz bulunmuştur. 250 farklı bitki türünde *In vitro* da androgenesis tekniğinde başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Bajaj 1983, George ve Sherrington 1984, Pierik 1984). İstatistik olarak önemli bulunan ortalamalar arasındaki farklılıkları ortaya koymak için EKÖF testi yapılmış ve sonuçları Çizelge 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.10. Üç ekmeklik buğday F₃ popülasyonunda farklı besi ortamında elde edilen kallus sayısında önemlilik grupları

Melez popülasyon	Kallus sayısı	Melez popülasyon x Çiçek tozu int.	Kallus sayısı
Krasunia/Sana	296.750 a	Krasunia/Sana x B	327.500
Pehlivan/F 85	51.125 b	Krasunia/Sana x A	266.000
F 85/Pehlivan	29.875 b	Pehlivan/F 85 x A	58.500
Çiçek tozu gelişim dönemi	Kallus sayısı	Pehlivan/F 85x B	43.750
B	134.250	F 85/Pehlivan x B	31.500
A	117.583		
EKÖF(0.05)	118.05	F 85/Pehlivan x A	28.250

Yapılan önemlilik testi sonucunda çeşitler arasında üç farklı grup oluşmuştur. En yüksek kallus sayısı 296.75 adet ile Krasunia/Sana melez popülasyonundan elde edilirken, bunu 51.13 adet kallus sayısı ile Pehlivan/F 85 melez popülasyonu izlemiştir. En düşük kallus sayısı ise 29.87 adet ile F 85/Pehlivan melez popülasyonunda olmuştur. Çiçek tozu gelişim dönemleri arasındaki farklılık istatistik olarak önemsiz bulunmuştur. En yüksek kallus sayısı

134.25 adet ile erken tek çekirdekli dönem ve vakuol tam oluşmuşken elde edilirken, erken tek çekirdekli dönem ancak vakuol tam oluşmadığında ise 117.58 adet kallus elde edilmiştir.

Melez popülasyonların çiçek tozuna tepkileri gözden geçirildiğinde, en yüksek kallus sayısı 327.50 adet ile Krasunia/Sana melezi ile erken tek çekirdekli dönem ve vakuol tam oluşmuşken elde edilmiştir. Bu çeşidi 266.00 adet kallus sayısı ile Krasunia/Sana melezinin erken tek çekirdekli dönem fakat vakuol tam oluşmadığındaki kallus sayısı izlemiştir. Yine Pehlivan/F 85 melez popülasyonunun erken tek çekirdekli dönem ve vakuol tam oluşmamış hali 58.50 adet kallus sayısı ile üçüncü sırada yer almıştır. En düşük kallus sayısı ise F 85/Pehlivan melez popülasyonunun erken tek çekirdekli dönem fakat vakuol tam oluşmamış halinde ve 28.25 adettir.

4.2.2 . Albino sayısı

Üç ekmeklik buğday F₃ popülasyonunda farklı çiçek tozu gelişim döneminin etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada elde edilen albino bitkicik sayılarında varyans analizi yapılmış, analiz sonuçları Çizelge 4.11’de verilmiştir.

Çizelge 4.11. Üç ekmeklik buğday F₃ popülasyonunda farklı besi ortamında elde edilen albino bitkicik sayıları için varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik derecesi	Kareler Ortalaması	F hesap	F çizelge	
				0.05	0.01
Melez popülasyon	2	10524.667	82.215**	4.260	8.020
Hata-1	9	128.014			
Çiçek tozu gelişimi	1	2.042	0.010	5.120	10.560
Melez popülasyon x Çiçek tozu int.	2	26.167	0.122	4.260	8.020
Hata-2	9	214.792			
Genel	23	1051.694			

Yapılan varyans analizi sonucunda incelenen çeşitlerin albino bitkicik sayıları arasındaki farklılıklar istatistik olarak 0.01 düzeyinde önemli bulunurken, uygulanan iki farklı çiçek tozu gelişim döneminin etkisi ise istatistik olarak önemsiz bulunmuştur. Melez popülasyonların çiçek tozu gelişim dönemlerindeki tepkilerini gösteren melez popülasyon x çiçek tozu interaksyonu ise istatistik olarak önemsiz bulunmuştur. İstatistik olarak önemli

bulunan ortalamalar arasındaki farklılıkları ortaya koymak için EKÖF testi yapılmış ve sonuçları Çizelge 4.12’de verilmiştir.

Çizelge 4.12. Üç ekmeklik buğday F₃ popülasyonunda farklı besi ortamında elde edilen albino bitkicik sayısında önemlilik grupları

Melez popülasyon	Kallus sayısı	Melez popülasyon x Çiçek tozu int.	Kallus sayısı
Krasunia/Sana	69.125 a	Krasunia/Sana x B	69.750
Pehlivan/F 85	8.125 b	Krasunia/Sana x A	68.500
F 85/Pehlivan	4.625 b	Pehlivan/F 85 x A	10.500
Çiçek tozu gelişim dönemi	Kallus sayısı	Pehlivan/F 85 x B	5.750
A	27.583		
B	27.000	F 85/Pehlivan x B	5.500
EKÖF(0.05)	34.28	F 85/Pehlivan x A	3.750

Yapılan önemlilik testi sonucunda çeşitler arasında iki farklı grup oluşmuştur. En yüksek albino bitkicik sayısı 69.13 adet ile Krasunia/Sana melezinden elde edilirken, bunu 8.13 adet kallus sayısı ile Pehlivan/F 85 melez popülasyonu izlemiştir. En düşük albino bitkicik sayısı ise 4.63 adet ile F 85/Pehlivan melez popülasyonunda olmuştur. Gelişim dönemleri arasındaki farklılık istatistik olarak önemsiz bulunmuştur. En yüksek albino bitkicik sayısı 27.58 adet ile erken tek çekirdekli dönem fakat vakuol henüz oluşmamışken elde edilirken, erken tek çekirdekli dönem ve vakuol tam oluşmuşken ise 27.00 adet albino bitkicik elde edilmiştir. Araştırmacılar yaptıkları çalışmada çiçek tozu gelişim döneminin anter kültüründe yanıt üzerine önemli etki yaptığını belirtmişlerdir (Hassawai ve Liong 1990, Machii ve ark. 1998).

Melez popülasyonların çiçek tozuna tepkileri gözden geçirildiğinde, en yüksek albino bitkicik sayısı 69.75 adet ile Krasunia/Sana melezinde erken tek çekirdekli dönem ve vakuol tam oluşmuşken elde edilmiştir. Bu melezi 68.50 adet albino bitkicik sayısı ile Krasunia/Sana’nın erken tek çekirdekli dönem ve vakuol henüz oluşmamış dönemindeki kallus sayısı izlemiştir. Pehlivan/F 85 melez popülasyonun erken tek çekirdekli dönem ve vakuol henüz oluşmamış dönemindeki 10.50 adet albino bitkicik sayısı ile üçüncü sırada yer almıştır. En düşük albino bitkicik sayısı ise F 85/Pehlivan popülasyonunun erken tek çekirdekli dönem fakat vakuol oluşmamış döneminde ve 3.75 adettir.

4.2.3. Yeşil bitkicik sayısı

Üç ekmeklik buğday F₃ popülasyonunda farklı çiçek tozu gelişim döneminin anter kültürü üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada elde edilen yeşil bitkicik sayılarında varyans analizi yapılmış, analiz sonuçları Çizelge 4.13’de verilmiştir.

Çizelge 4.13. Üç ekmeklik buğday F₃ popülasyonunda farklı besi ortamında elde edilen yeşil bitkicik sayısı için varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik derecesi	Kareler Ortalaması	F hesap	F çizelge	
				0.05	0.01
Melez popülasyon	2	484.042	31.944**	4.260	8.020
Hata-1	9	15.153			
Çiçek tozu gelişimi	1	77.042	3.296	5.120	10.560
Melez popülasyon x Çiçek tozu int.	2	713.042	30.504	4.260	8.020
Hata-2	9	23.375			
Genel	23	122.520			

Yapılan varyans analizi sonucunda incelenen melez popülasyonların yeşil bitkicik sayıları arasındaki farklılıklar istatistik olarak 0.01 düzeyinde önemli bulunurken, uygulanan iki farklı çiçek tozu gelişim döneminin etkisi ise istatistik olarak önemsiz bulunmuştur. Melez popülasyonların çiçek tozuna tepkileri olan melez popülasyon x çiçek tozu interaksyonu ise istatistik olarak önemsiz bulunmuştur. İstatistik olarak önemli bulunan ortalamalar arasındaki farklılıkları ortaya koymak için EKÖF testi yapılmış ve sonuçları Çizelge 4.14’de verilmiştir.

Çizelge 4.14. Üç ekmeklik buğday F₃ popülasyonunda farklı besi ortamında elde edilen yeşil bitkicik sayısında önemlilik grupları

Melez popülasyon	Kallus sayısı	Melez popülasyon x Çiçek tozu int.	Kallus sayısı
Krasunia/Sana	22.500 a	Krasunia/Sana x B	34.500
F 85/Pehlivan	9.625 b	F 85/Pehlivan x A	16.250
Pehlivan/F 85	8.500 b	Krasunia/Sana x A	10.500
Çiçek tozu gelişim dönemi	Kallus sayısı	Pehlivan/F 85 x B	8.500
B	15.333	Pehlivan/F 85 x A	8.500
A	11.750	F 85/Pehlivan x B	3.000
EKÖF(0.05)	11.73		

Yapılan önemlilik testi sonucunda melez popülasyonlar arasında iki farklı grup oluşmuştur. En yüksek yeşil bitkicik sayısı 22.50 adet ile Krasunia/Sana melez popülasyonundan elde edilirken, bunu 9.63 adet yeşil bitkicik sayısı ile F 85/Pehlivan melez popülasyonu izlemiştir. En düşük yeşil bitkicik sayısı ise 8.50 adet ile Pehlivan/F 85 melez popülasyonunda olmuştur. Çiçek tozu gelişim dönemleri arasındaki farklılık istatistik olarak önemsiz bulunmuştur. En yüksek yeşil bitkicik sayısı 15.33 adet ile erken tek çekirdekli ve vakuol oluşmuş dönemde elde edilirken, erken tek çekirdekli fakat vakuol oluşmamış dönemde ise 11.75 adet yeşil bitkicik elde edilmiştir. Araştırmacılar anter kültüründe yeşil bitkicik oranının önemli oranda değişim gösterdiğini belirtmişlerdir (Genovesi ve Collins 1982, Maddock ve ark. 1983, Lörz 1983).

Çeşitlerin çiçek tozuna tepkileri gözden geçirildiğinde, en yüksek yeşil bitkicik sayısı 34.50 adet ile Krasunia/Sana genotipi ile erken tek çekirdekli ve vakuol oluşmuş dönemde elde edilmiştir. Bu çeşidi 16.25 adet yeşil bitkicik sayısı ile F 85/Pehlivan melezin erken tek çekirdekli fakat vakuol oluşmamış dönemindeki kallus sayısı izlemiştir. Krasunia/Sana melez popülasyonu erken tek çekirdekli fakat vakuol oluşmamış dönemindeki 10.50 adet yeşil bitki sayısı ile üçüncü sırada yer almıştır. En düşük yeşil bitkicik sayısı ise F 85/Pehlivan popülasyonununun erken tek çekirdekli ve vakuol oluşmuş döneminde ve 3.00 adettir.

4.2.4. Seraya aktarılan bitki sayısı

Üç ekmeklik buğday F₃ popülasyonunda farklı çiçek tozu gelişim döneminin anter kültürü üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada elde edilen seraya aktarılan bitki sayılarında varyans analizi yapılmış, analiz sonuçları Çizelge 4.15’de verilmiştir.

Çizelge 4.15. Üç ekmeklik buğday F₃ popülasyonunda farklı besi ortamında elde edilen kallus sayıları için varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik derecesi	Kareler Ortalaması	F hesap	F çizelge	
				0.05	0.01
Melez popülasyon	2	448.875	31.967**	4.260	8.020
Hata-1	9	14.042			
Çiçek tozu gelişimi	1	108.375	5.363*	5.120	10.560
Melez popülasyon x Çiçek tozu int.	2	660.125	32.666**	4.260	8.020
Hata-2	9	20.208			
Genel	23	114.549			

Yapılan varyans analizi sonucunda incelenen çeşitlerin seraya aktarılan bitki sayıları arasındaki farklılıklar istatistik olarak 0.01 düzeyinde önemli bulunurken, uygulanan iki farklı çiçek tozu gelişim döneminin etkisi de istatistik olarak 0.05 düzeyinde önemli bulunmuştur. Melez popülasyonun çiçek tozuna tepkileri olan melez popülasyon x çiçek tozu interaksyonu ise istatistik olarak 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur. İstatistik olarak önemli bulunan ortalamalar arasındaki farklılıkları ortaya koymak için EKÖF testi yapılmış ve sonuçları Çizelge 4.16’da verilmiştir.

Çizelge 4.16. Üç ekmeklik buğday F₃ popülasyonunda farklı besi ortamında elde edilen seraya aktarılan bitki sayısında önemlilik grupları

Melez popülasyon	Kallus sayısı	Melez popülasyon x Çiçek tozu interaksyonu	Kallus sayısı
Krasunia/Sana	20.750 a	Krasunia/Sana x B	32.750
F 85/Pehlivan	8.375 b	F 85/Pehlivan x A	14.250
Pehlivan/F 85	7.250 b	Krasunia/Sana x A	8.750
Çiçek tozu gelişim dönemi	Kallus sayısı	Pehlivan/F 85 x B	7.500
B	14.250 a	Pehlivan/F 85 x A	7.000
A	10.000 b	F 85/Pehlivan x A	2.500
EKÖF(0.05)	11.29		

Yapılan önemlilik testi sonucunda çeşitler arasında iki farklı grup oluşmuştur. En yüksek seraya aktarılan bitki sayısı 20.75 adet ile Krasunia/Sana genotipinden elde edilirken, bunu 8.37 adet seraya aktarılan bitki sayısı ile F 85/Pehlivan melez popülasyonu izlemiştir. En düşük seraya aktarılan bitki sayısı ise 7.25 adet ile Pehlivan/F 85 melez popülasyonunda olmuştur. Çiçek tozu gelişim dönemleri arasındaki farklılık istatistik olarak önemli bulunmuştur. En yüksek seraya aktarılan bitki sayısı 14.25 adet ile erken tek çekirdekli ve vakuol oluşmuş dönemde elde edilirken, erken tek çekirdekli fakat vakuol oluşmamış dönemde ise 10.00 adet seraya aktarılan bitki sayısı elde edilmiştir. Araştırmacılar anter kültüründe yanıtta farklı kromozomal bölgelerin etkili olduğunu belirtmişlerdir (Petolina 1998, Armstrong ve ark. 1992, Wang ve ark. 1993).

Melez popülasyonlarının çiçek tozuna tepkileri gözden geçirildiğinde, en yüksek seraya aktarılan bitki sayısı 32.75 adet ile Krasunia/Sana melez popülasyonu ile erken tek çekirdekli ve vakuol oluşmuş dönemde elde edilmiştir. Bu çeşidi 14.25 adet seraya aktarılan bitki sayısı ile F 85/Pehlivan melezin erken tek çekirdekli fakat vakuol oluşmamış dönemde seraya aktarılan bitki sayısı izlemiştir. Krasunia/Sana melez popülasyonu erken tek çekirdekli fakat vakuol oluşmamış dönemindeki 8.75 adet seraya aktarılan bitki sayısı ile üçüncü sırada

yer almıştır. En düşük seraya aktarılan bitki sayısı ise F 85/Pehlivan popülasyonununun erken tek çekirdekli fakat vakuol oluşmamış döneminde ve 2.50 adettir.

4.3. Ekmeklik buğday melez popülasyonlarında anter kültürüne yanıt

4.3.1. Kallus sayısı

Oniki ekmeklik buğday F₃ popülasyonunda yapılan anter kültüründe elde edilen kallus sayılarında varyans analizi yapılmış, varyans analiz sonuçları Çizelge 4.17’de verilmiştir.

Çizelge 4.17. Oniki ekmeklik buğday F₃ popülasyonlarında elde edilen kallus sayıları için varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F hesap	F çizelge	
					0.05	0.01
Melez popülasyon	11	326371.167	29670.106	7.944**	2.000	2.670
HATA	36	134451.500	3734.764			
Genel	47	460822.667	9804.738			

Yapılan varyans analizi sonucunda incelenen çeşitlerde kallus sayıları arasındaki farklılıklar istatistik olarak 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur. İstatistik olarak önemli bulunan ortalamalar arasındaki farklılıkları ortaya koymak için EKÖF testi yapılmış ve sonuçları Çizelge 4.18’de verilmiştir.

Çizelge 4.18. Oniki ekmeklik buğday F₃ popülasyonlarında elde edilen kallus sayılarında önemlilik grupları

Melez popülasyonlar	Kallus sayısı
Pehlivan/Sana	232.000 a
Syrena/Krasunia	206.750 ab
Golia/Syrena	205.750 ab
F 85/Golia	201.250 ab
Sadova/Sana	167.750 ab
F 85/Sana	142.250 bc
Syrena/Pehlivan	71.000 cd
Pehlivan/Sadova	42.250 d
Krasunia/Syrena	32.750 d
Sadova/Pehlivan	26.250 d
Pehlivan/Bezostoja 1	19.250 d
Sana/Krasunia	18.750 d
EKÖF(0.05)	89.02

Denemeye alınan buğday popülasyonlarında kallus sayısı 17.75-232.00 adet arasında değişmiştir. En fazla kallus sayısı 232.00 adet ile Pehlivan/Sana melezinde elde edilirken, bunu, 206.75 adet kallus sayısı ile Syrena/Krasunia, 205.75 adet ile Golia/Syrena melez popülasyonu, 201.25 adet ile F 85/Golia ve 167.75 adet ile Sadova/Sana melez buğday popülasyonları izlemiştir. Anter kültüründe kallus yanıtı yönünden 18.75 adet ile Sana/Krasunia melez popülasyonu en düşük değeri verirken, bunu 19.25 adet ile Pehlivan/Bezostoja 1, 26.25 adet ile Sadova/Pehlivan ve 32.75 adet ile Krasunia/Syrena melez buğday popülasyonları izlemiştir. Elde edilen verilerden de görüldüğü gibi tüm melez kombinasyonlarında kallus yanıtı elde edilmiştir. Bu genotiplerden 6 tanesinde yüzün üzerinde kallus elde edilmiştir. Anter kültüründe kallus yanıtının genotiplere göre değiştiği belirtilmiştir (Henry de Buyser 1985, Szakacs ve ark. 1989, Başer ve ark. 1999, Korkut ve ark. 2003).

4.3.2. Albino bitkicik sayısı

Oniki ekmeklik buğday F₃ popülasyonunda anter kültürü uygulamasında elde edilen albino bitkicik sayılarında varyans analizi yapılmış, varyans analiz sonuçları Çizelge 4.19'da verilmiştir.

Çizelge 4.19. Oniki ekmeklik buğday F₃ popülasyonlarında elde edilen albino bitkicik sayıları için varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F hesap	F çizelge	
					0.05	0.01
Melez popülasyon	11	15224.129	1384.012	6.777**	2.000	2.670
HATA	32	6535.417	204.232			
Genel	43	21759.545	506.036			

Yapılan varyans analizi sonucunda incelenen melez popülasyonların albino bitkicik sayıları arasındaki farklılıklar istatistik olarak 0.01 düzeyinde önemli bulunurken, istatistik olarak önemli bulunan ortalamalar arasındaki farklılıkları ortaya koymak için EKÖF testi yapılmış ve sonuçları Çizelge 4.20'de verilmiştir.

Çizelge 4.20. Oniki melez buğday F₃ popülasyonlarında albino bitkicik sayısında önemlilik grupları

Melez populasyonlar	Kallus sayısı
F 85/Golia	61.500 a
Pehlivan/Sana	43.750 ab
F 85/Sana	40.750 abc
Syrena/Krasunia	39.250 abc
Sadova/Sana	32.250 abc
Golia/Syrena	22.500 abc
Syrena/Pehlivan	17.000 bc
Sadova/Pehlivan	7.333 bc
Krasunia/Syrena	6.000 bc
Pehlivan/Bezostoja 1	5.250 bc
Pehlivan/Sadova	4.500 bc
Sana/Krasunia	1.000 c
EKÖF(0.05)	33.85

Yapılan önemlilik testi sonucunda melez popülasyonlar arasındaki farklılık önemli bulunmuştur. Anter kültüründe yanıtın büyük oranda genotipe bağlı olduğu ve önemli oranda albino bitkicik elde edildiği belirtilmiştir (Tomes 1990, Razdan 1992, Saidi ve ark. 1997). Oniki buğday popülasyonunda kallus sayısı 1.00-65.50 adet arasında değişmiştir. Buğday melezlerinin tümünden albino bitkicik elde edilirken, 6 adet melezde 20'nin üzerinde albino bitkicik elde edilmiştir. En yüksek albino bitkicik sayısı 61.50 adet ile F 85/Golia genotipinde elde edilirken, bunu 43.75 adet kallus sayısı ile Pehlivan/Sana melez popülasyonu izlemiştir. 40.75 adet ile F 85/Sana, 39.25 adet ile Syrena/Krasunia, 32.25 adet albino bitkicik sayısı ile Sadova/Sana ve 22.50 adet albino bitkicik sayısı ile Golia/Syrena melez popülasyonu bu melezleri izlemiştir. Anterlerde albino bitkicik sayısının melez popülasyonlara ve diğer uygulamalara göre önemli oranda değiştiği belirtilmiştir (Başer ve ark. 1999, Korkut ve ark. 2003, Hassawai ve ark. 2005). En düşük albino bitkicik sayısı ise 1.00 adet ile Sana/Krasunia melez popülasyonunda olmuştur. Bunu 4.5 adet kallus ile Pehlivan/Sadova, 5.25 adet kallus ile Pehlivan/Bezostoja 1, 6.00 adet kallus ile Krasunia/Syrena ve 7.33 adet kallus sayısı ile Sadova/Pehlivan melez buğday popülasyonları izlemiştir.

4.3.3. Yeşil bitkicik sayısı

Oniki ekmeklik buğday F₃ popülasyonunda anter kültürü uygulamasında elde edilen yeşil bitkicik sayılarında varyans analizi yapılmış ve analiz sonuçları Çizelge 4.21’de verilmiştir.

Çizelge 4.21. Oniki ekmeklik melez buğday F₃ popülasyonlarında elde edilen yeşil bitkicik sayıları için varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F hesap	F çizelge	
					0.05	0.01
Melez popülasyon	11	16174.893	1470.445	23.799**	2.090	2.840
HATA	30	1853.583	61.786			
Genel	41	18.028.476	439.719			

Yapılan varyans analizi sonucunda incelenen çeşitlerde yeşil bitkicik sayıları arasındaki farklılıklar istatistik olarak 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Genetik haritalama çalışmalarında double haploidlerin önemli kaynak olduğu belirtilmiştir (Anonim 2011). İstatistik olarak önemli bulunan ortalamalar arasındaki farklılıkları ortaya koymak için EKÖF testi yapılmış ve sonuçları çizelge 4.22’de verilmiştir.

Çizelge 4.22. Oniki melez buğday F₃ popülasyonlarında yeşil bitkicik sayısında önemlilik grupları

Melez popülasyonlar	Yeşil bitki sayısı
Golia/Syrena	70.500 a
Syrena/Pehlivan	25.000 b
F 85/Golia	14.000 bc
Sadova/Pehlivan	6.250 bc
Syrena/Krasunia	6.000 bc
Pehlivan/Sadova	5.750 bc
Pehlivan/Sana	5.333 bc
Sadova/Sana	4.000 bc
Krasunia/Syrena	3.250 bc
F 85/Sana	2.333 bc
Sana/Krasunia	2.000 c
Pehlivan/Bezostoja 1	1.500 c
EKÖF(0.05)	18.62

Yapılan önemlilik testi sonucunda melez populasyoblar arasında yeşil bitkicik yanıtı yönünden istatistik olarak önemli farklılık bulunmuştur. Anterlerden elde edilen yeşil bitkicik sayısının yüksek oranda genotipe bağlı olarak değiştiği belirtilmiştir (Lashermes ve ark. 1991, Hatipoğlu ve ark. 1994, Holme ve ark. 1999, Barbanas ve ark. 2001, Korkut ve ark. 2003, Konieczny 2003, Hassawai ve ark. 2005, Salantur ve ark. 2011). Yeşil bitki sayısı 1.50-70.50 adet arasında değişmiştir. Üç melez popülasyonda ortalama olarak 10'un (4 tekrarlama) üzerinde bir diğer ifade ile toplamda 50'nin üzerinde bitkicik elde edilmiştir. En fazla bitkicik sayısı ortalama 70.50 adet ile Golia/Syrena genotipinde elde edilirken, bunu 25.00 adet bitkicik sayısı ile Syrena/Pehlivan melez popülasyonu ve 14.00 adet ile F 85/Golia melez popülasyonları izlemiştir. En az yeşil bitkicik sayısı ise 1.50 adet ile Pehlivan/Bezostoja 1 melez popülasyonunda olmuştur. Bunu 2.00 adet yeşil bitkicik sayısı ile Sana/Krasunia, 2.33 adet ile F-85/Sana ve 3.25 adet ile Krasunia/Syrena melez buğday popülasyonu izlemiştir.

4.3.4. Seraya aktarılan bitki sayısı

Oniki ekmeklik buğday F₃ popülasyonunda anter kültürü uygulamasında elde edilen seraya aktarılan bitki sayılarında varyans analizi yapılmış ve analiz sonuçları Çizelge 4.23'de verilmiştir.

Çizelge 4.23. Oniki ekmeklik melez buğday F₃ popülasyonlarında elde edilen seraya aktarılan bitki sayıları için varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F hesap	F çizelge	
					0.05	0.01
Faktor-A	11	11823.905	1074.900	22.407**	2.090	2.840
HATA	30	1439.167	47.972			
Genel	41	13263.071	323.490			

Yapılan varyans analizi sonucunda incelenen melez popülasyonlarda seraya aktarılan bitki sayıları arasındaki farklılıklar istatistik olarak 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Çok sayıda araştırmacı anter kültürü ile seraya yeşil bitki aktarmış ve bunlar üstün özellikli yeni

popülasyonlar ıslah etmişlerdir (De Buyser ve ark. 1987, Hu ve ark. 1983, Hu ve ark. 1988, Pauk ve ark. 1995, Barnabas ve ark. 2000, Thomas ve ark. 2003). İstatistik olarak önemli bulunan ortalamalar arasındaki farklılıkları ortaya koymak için EKÖF testi yapılmış ve sonuçları Çizelge 4.24’de verilmiştir.

Çizelge 4.24. Oniki ekmeklik buğday F₃ popülasyonunda seraya aktarılan bitki sayıları için önemlilik grupları

Melez popülasyonlar	Seraya aktarılan bitki sayısı
Golia/Syrena	59.250 a
Syrena/Pehlivan	23.250 b
F 85/Golia	11.750 bc
Sadova/Pehlivan	4.750 c
Syrena/Krasunia	4.250 c
Pehlivan/Sadova	4.250 c
Pehlivan/Sana	4.000 c
Sadova/Sana	3.333 c
Krasunia/Syrena	2.250 c
Sana/Krasunia	1.500 c
Pehlivan/Bezostaja 1	1.250 c
F 85/Sana	1.000 c
EKÖF(0.05)	16.41

Yapılan önemlilik testi sonucunda melez popülasyonlar arasındaki farklılık istatistik olarak önemli bulunmuştur. Anter kültüründe yanıtın dominant genler tarafından kontrol edilen basit bir kalıtıma sahip olduğu (Afele ve Kannenberg 1990) anter kültüründe en önemli sorunun genotipe bağlılık olduğu belirtilmektedir (Enginözü 2006, Ahmet ve Adak 2007, Foster ve ark. 2009). Oniki buğday mezinde seraya aktarılan bitki sayısı ortalama olarak 1.00-59.25 adet arasında değişmiştir. Oniki melezin tümünde anter kültürüne yanıt alınırken yedi mezde elde edilen ortalama bitki sayısı 4’ün (toplam 16) üzerinde olmuştur. En fazla seraya aktarılan bitki sayısı 59.25 adet ile Golia/Syrena genotipinde elde edilirken, bunu 23.25 adet bitkicik sayısı ile Syrena/Pehlivan ve 11.75 adet ile F 85/Golia melez popülasyonları izlemiştir. En az bitki sayısı ise 1.00 ile F 85/Sana melez popülasyonunda olmuş, bunu 1.25 adet ile Pehlivan/Bezostaja 1 ve 1.50 adet ile Sana/Krasunia mezinden elde edilen bitkicik sayıları izlemiştir. Değişik ülkelerde, günümüzde anter kültürü buğday ıslahının vazgeçilmez bir parçasıdır (Çakır ve ark. 2003, Belchev ve ark. 2004).

5. SONUÇ

Çalışmada F₃ generasyonunda seçilmiş 19 ekmeklik ve makarnalık buğday melez popülasyonu materyal olarak kullanılmıştır.

Çalışmada C₁₇F ve W₁₄F sıvı besi ortamları kullanılmıştır. İki farklı besi ortamının anter kültürü üzerine etkileri incelendiğinde kallus sayısında besi ortamının etkisi önemli bulunurken, albino bitkicik, yeşil bitkicik ve seraya transfer edilen bitki sayısı üzerine etkisi önemsiz bulunmuştur.

Çiçek tozu gelişim dönemlerinin anter kültürü üzerine etkisi incelendiğinde erken tek çekirdekli (vakuol tam oluşmuş) dönemde çiçek tozu içeren anterlerden daha yüksek yeşil bitkicik ve seraya aktarılan bitki elde edilmiştir.

Oniki buğday melez popülasyonunda anter kültürüne yanıtı incelendiğinde melez popülasyonlar arasında önemli farklılık olduğu belirlenmiştir.

Yapılan önemlilik testi sonucunda, melez popülasyonlar arasında yeşil bitkicik yanıtı yönünden istatistik olarak önemli farklılık bulunmuştur. Yeşil bitkicik sayısı 1.50-70.50 adet arasında, seraya aktarılan bitki sayısı ortalama olarak 1.00-59.25 adet arasında değişmiştir. En fazla bitkicik sayısı ve seraya aktarılan bitki sayısı 70.50 adet ve 59.25 ile Golia/Syrena genotipinde elde edilmiştir. Bunu 25.00 adet bitkicik ve 23.25 adet seraya aktarılan bitki sayısı ile Syrena/Pehlivan ve 14.00 adet bitkicik ve 11.75 adet seraya aktarılan bitki sayısı ile F 85/Golia melez popülasyonları izlemiştir. En az yeşil bitkicik sayısı 1.50 adet ile Pehlivan/Bezostoja 1'de ve seraya aktarılan bitki sayısı ise 1.00 adet ile F-85/Sana melez popülasyonunda bulunmuştur.

Sonuç olarak;

- Besi ortamlarının kallus sayısını etkilediği ancak gelişen albino, yeşil bitkicik ve seraya aktarılan bitki sayısı üzerine etkisinin önemli olmadığı,
- Çiçek tozu gelişim döneminin anter kültürüne yanıtta önemli olduğu ve erken tek çekirdekli (vakuol tam) dönemin en uygun dönem olduğu,
- Ekmeklik buğdayda anter kültürüne yanıtın oldukça yüksek düzeyde olduğu, incelenen tüm genotiplerden yanıt alındığı,

- d. Anter kültüründe yanıtın yüksek oranda genotipe bağlı olduğu, bazı genotiplerde 200'e yakın bazılarında ise az sayıda bitkicik elde edildiği,
- e. Makarnalık buğdayda yanıtın oldukça düşük olduğu,
- f. En fazla kallus sayısının, Pehlivan/Sana, Syrena/Krasunia ve Golia/Syrena melez popülasyonlarında grldğu,
- g. Albino bitkicik sayısı yönünden F 85/Golia ve Pehlivan/Sana melez popülasyonlarının ilk sırada olduğu,
- h. Yeşil bitkicik sayısı ve seraya aktarılan bitki sayısı yönünden Golia/Syrena, Syrena/Pehlivan ve F 85/Golia melez popülasyonlarının en iyi değer verdiği,
- i. Anter kültünün ekmeclik buğday melezleme ıslahında oldukça başarılı sonuçlar verdiği belirlenmiştir.

6. KAYNAKLAR

- Abd-el Maksoud MM, Bedo Z (1993). Genotypes and genotype x medium interaction in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Cereal Research Communications*, Vol.21.No.1:17-24.
- Acar H (1997). Arpada doku kültürü ve bitki ıslahında yararlanma olanakları. Seminer, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Ankara.
- Afele JC and Kannenberg LW (1990). Genetic studies of corn (*Zea mays* L.) anther culture response. *Theoretical And Applied Genetic*, 80 (4): 459-464.
- Ahmet H. ve Adak MS, (2007). Irak'ta yetiştirilen bazı ekmeklik buğday çeşitlerinde kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 13(3): 285-291.
- Anonim (2010). Tarım İstatistikleri Özeti 1988-2009. T.C. Başbakanlık Türkiye İstatistik Kurumu.
- Anonim 2011. <http://www.wheatcap.org>.
- 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.
- Bajaj YPS, Springer I (1983). *In vitro* production of haploids. 549 p. Verlag, Berlin.
- Bajaj YPS (1990). *In vitro* production of haploids and their use in cell genetics and plant breeding. *Haploids in Crop Improvement*, Ed: Y.P.S. Bajaj. 1. Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol. 12. Springer, Berlin, 3-44.
- 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 E, Szakacs E, Karsai I, and Bedö Z (2001). *In vitro* androgenesis of wheat. From Fundamentals to practical application, 119: 211-216.
- Başer İ, Korkut KZ, Turhan H ve Bilgin O (1999). Anter kültüründen yararlanarak kışlık ekmeklik buğday çeşit ve popülasyonlarında haploid bitkilerin elde edilme olanakları. *Türkiye 3. Tarla Bitkileri Kongresi, Cilt (I)*, 29-34, Adana.
- Belchev I, Tchorbadjieva M ve Pantchev I (2004). Effect of 5-azacytidine on callus induction and plant regeneration potential in anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiol*, 30 (1-2), 45-50.
- Bajaj YPS (1990). *Biotechnology in Agricultural and Forestry 12. Haploids in Crop Improvement*.

- Bürün B (1996). Buğdaygillerde in vitro kültürler. Yüzüncü yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 6(4): 18-95.
- Cakir M, Appels R, Carter M, Loughman R, Francki M, Li C, Johnson J, Bhave M, Wilson R, McLean R, and Barley I, (2003). Accelerated wheat breeding using molecular markers. Wheat Genetic Symposium, 1: 117-120, Roma- Italy.
- Clausen RE, and Mann MC, (1924). Inheritance in *Nicotiana tabacum*. V. The occurrence of haploid plants in interspecific progenies, 10: 121-124.
- De Buyser J, Henry Y, Lonet P, Hertzog R, and Hepsel A. (1987). Florin: A doubled haploid wheat variety developed by the anther culture method. *Plant Breeding*, 98:53-56.
- Delporte F, Mostade O and Jacquemin JM (2001). Plant regeneration through callus initiation from thin mature embryo fragments of wheat. *Plant Cell Tissue Organic Culture*, 67: 73-80.
- Dunwell CM (1981). Influence of Genotype and Environment on Growth of Barley Embryos in vitro. *Annals of Botany*, 48: 535-542.
- Enginözü M (2006). Donör bitkilerin yetiştirme koşulları ve farklı kültür sıcaklıklarının ekmeçlik buğday (*Triticum aestivum* L.) anter kültüründe haploid bitki rejenerasyonuna etkileri üzerine bir araştırma. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı.
- Foster BP, Touraev A, Jain SM (2009). *Advances in Haploid Production in Higher Plants*, 12 110.
- Ganese F, Amer J. and Aase HC, (1926). A haploid wheat plantulation *Botanic* 13: 373-385
- Genovesi AD and Collins GB 1982. In vitro Production of haploid plants via anther culture. *Crops Sci.* 22(6):1137-1144.
- George EF, Sherrington PD, (1984). *Plant Propagation by Tissue Culture*. Eastern Press, 314-324.
- Guha S ve Mahasvari SC, (1964.) In vitro production of embryos from anther of *Datura*. *Nature* 204 : 497.
- Guha S, Maheshwari SC., 1966. Cell Division and Differentiation of Embryos in the Pollen Grains of *Datura in vitro*. *Nature*, 212, 97.
- Hassawai DS and Liong GH (1990). Effects of Growth Regulator and Genotype of Production of Wheat and Triticale Polyhaploids from Anther Culture. *Plant Breed.*, 104:40 45.
- Hassawai DS, Qrunfleh I, Dradkah N, 2005. Production of Doubled Haploids from some Jordanian Wheat Cultivars via Anther Culture Technique. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 3, 161-164

- Hatipoglu R, Genç İ ve Yagabasanlar T (1994). Ekmeklik Bugday (*Triticum aestivum* L.) Islahında Anter Kültüründe Yararlanma Olanakları Üzerinde Arastirmalar. Tarla Bitkileri Kongresi Cilt (II8) Bitki Islahı Bildirileri s: 254–256, Bornova / İzmir.
- Hatipoglu R. und Doğramacı M (1995). Die wirkungen von genotyp, kulturmedium sowie gelierstoff auf die antherenkulture von weizen. Deutsch-Türkische agarforschung-Deutsche- Türkisches symposium, p: 139–146, Ankara.
- Henry Y, de Buyser J (1985). Effect of the 1B/1R translocation on anther culture ability in wheat (*Triticum aestivum* L.) Plant Cell Reproduction, 4: 307-310.
- Henry Y and de Buyser J (1990). Wheat anther culture: agronomie performance of doubled haploid lines and the release of a new variety "Florin". Biotechnology in Agriculture and Forestry, Volume 13, Ed: Y.P.S. BAJAJ Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg.
- Holme IB, Olesen A, Hansen NJP and Andersen S, (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 sporophyt 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.
- Konieczny R, Czaplicki AZ, Golczyk H and Przywara L (2003). Two pathways of plant regeneration in wheat anther culture. Plant Cell Tissue Organ Culture 73, 177- 187.
- Korkut KZ, Başer İ, Turhan H, Bilgin O (2001). Yerli ve yabancı kökenli ekmeklik buğday çeşit ve hatlarında haploid ve dihaploid genotiplerin elde edilme olanakları. TÜAF-232. Tekirdağ.
- Korkut KZ, Başer İ, Turhan H and Bilgin O (2003). Androgenetic Plant Production In Local Foreign Bread Wheat Genotypes. Turkish Journal Of Field Crops, 8:1, 9-14.
- Korkut KZ, (2009). Çeltik Genotiplerinde Anter Kültürü Olanakları. XVI. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, 177-179, Antalya.
- Lashermes P, Engin G and Ferrara GO (1991). Anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) adapted to dry areas of West Asia and North Africa. Journal of Genetic Breeding, 45, 33–38.
- Lörz H (1989). In vitro manipulation of cereal crops. Review of Advances in Plant Biotechnology, 1985-88.

- Machii H, Mizuno H, Hirabayashi T, Li H and Hagio T (1998). Screening wheat genotypes for high callus induction and regeneration capability from anther and immature embryo cultures. *Plant Cell Tissue Organic Culture*, 53,67-74.
- Maddock SE, Lancaster VA, Risiott R and Franklin J (1983). Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of 25 cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Experimental Botanic* 34 (144): 915–926.
- 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.
- Orshinsky BR, Sadasivaiah RS (1994). Effects of media on embryoid induction and plant regeneration from cultured anthers of soft white spring wheats (*Triticum aestivum* L.). *Plant Science*, 102:99–107
- Özgen M ve Akar T (1993). Yabani gen kaynaklarının bitki ıslahında kullanımı. I. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi, 7s, İzmir.
- Özgen M, Türet M, Özcan S and Sancak C (1996). Callus induction and plant regeneration from immature and mature embryos of winter durum wheat genotypes. *Plant Breeding*, 115: 455–458
- Özgen M, Türet M, Altınok S and Sancak C 1998. Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *Plant Cell Rep.*, 18; 331-335.
- Özgen M, Adak MS, Söylemezoğlu G ve Ulukan H 2000. Bitkisel gen kaynaklarının koruma ve kullanımında yeni yaklaşımlar. Türkiye Ziraat Mühendisliği V. Teknik kongresi, 259–289, Ankara.
- Özgen M, Türet M and Avcı M (2001). Cytoplasmic effects on the tissue culture response of callus from winter wheat mature embryos. *Plant Cell Tissue Organic Culture*, 64: 81–84.
- Pauk J, Kertesz Z, Beke B, Bona L, Csösz M and Matuz J, (1995). New winter wheat variety: ‘GK Delibab’ developed via combining conventional breeding and *In vitro* androgenesis. *Cereal Research Community*, 23(3): 251-256.
- Pauk J, Mihaly R and Puolimatka M, (2003). Protocol for wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. *Doubled Haploid Production in Crop Plants*, 59-64.
- Pescitelli SM, Johnson CD, Petolino JF (1990). Isolated microspore culture of maize: effect of isolation technique, reduced temperature, and sucrose level. *Plant Cell Reports*, 8:628–631.
- Pierik RLM (1989). *In vitro* Culture of Higher Plants. *Plant Cell Reports*, 344pp

- Razdan MK (1992). Haploid Production. An Introduction to Plant Tissue Culture. Oxford and IBH. Publication, 105-124.
- Saidi N, Cherkaoui S, Chlyah A, Chlyah H (1997). Embryo Formation and Regeneration in *Triticum turgidum* ssp.durum Anther Culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 51: 27-33.
- Salantur A, Yazar S, Dönmez E, Akar T (2011). Kışlık Ekmeklik Buğday F₂ Popülasyonlarının Anter Kültüründe Bitki Rejenarasyonuna Tepkisinin Belirlenmesi Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi, 2011, 20 (1): 15-21.
- Sarıer SY (2010). Mısır bitkisinde anter kültürü olanakları üzerine araştırmalar. Yayınlanmamış yüksek lisans tezi, Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 56s.
- Szakacs E, Kovacs G, Pauk J and Barbanas B (1989). Substitution analysis of callus induction and plant regeneration from anther culture in wheat (*Triticum aestivum* L.) anthers. Plant Cell Reports, 7: 218-222.
- Szarejko I (2003). Doubled haploid mutant production. Doubled haploid production in crop plants, Eds: Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP, Szarejko I, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, pp 351–361.
- Şehirli S ve Özgen M (1998). Bitki ıslahı, A. Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları:1059, Ders kitabı: 310, A. Ü. Basımevi, Ankara 261 s.
- Thomas WTB, Forster BP, Gettersson B (2003). Doubled haploids in breedings. Doubled Haploid Production in Crop Plants, Eds: Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP, Szarejko I, Dordrecht/Boston/London, pp 337–350.
- Tomes DT (1990). Current research in biotechnology with application to plant breeding. Progress in Plant Cellular and Molecular Biology, Kluwer Academic Publishers, 23-32.
- Tulecke W, 1953. A Tissue Derived from the Pollen of *Ginkgo biloba*. Science, 117, 599-600.
- Vasil IK, Therge TA (1994). Plant Cell and Tissue Culture. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Boston, London, 548p.
- Wang XH, Lazzeri PA, and Lörz H (1993). Regeneration of haploid, dihaploid and diploid plants from anther-and embryo-derived cell suspensions of wild barley.

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Kırklareli’nde doğdu. İlkokul ve ortaokulu Tekirdağ’ın Muratlı ilçesinde, liseyi Tekirdağ Anadolu Lisesi’nde okudu. Kazandığı Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü’nden 2009 yılında mezun oldu ve aynı yıl Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi’nde yüksek lisans eğitimine başladı. Namık Kemal Üniversitesi’nde 2010 yılı ağustos ayında başlayan “Melez Mısır Hatlarında Dihaploid Hatların Elde Edilmesi ve Kullanılması” konulu TÜBİTAK projesinde bursiyer olarak çalışmakta ve evlidir.