



**BAZI ARPA POPÜLASYONLARINDA ANTER
KÜLTÜRÜ YÖNTEMİ İLE DOUBLE HAPLOİD
BİTKİ ELDESİNDE REJENERASYON
ORANININ ARTIRILMASI**

Ersin AKŞOR
Yüksek Lisans Tezi
Organik Tarım İşletmeciliği
Ana Bilim Dalı
Doç. Dr. Volkan GÜL
2024
(Her Hakkı Saklıdır)

T.C.
BAYBURT ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
ORGANİK TARIM İŞLETMECİLİĞİ ANA BİLİM DALI
ORGANİK TARIM İŞLETMECİLİĞİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

BAZI ARPA POPÜLASYONLARINDA ANTER KÜLTÜRÜ YÖNTEMİ İLE
DOUBLE HAPLOİD BİTKİ ELDESİNDE REJENERASYON
ORANININ ARTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ersin AKŞOR

Danışman: Doç. Dr. Volkan GÜL

BAYBURT - 2024

KABUL VE ONAY

Doç. Dr. Volkan GÜL danışmanlığında, 202206015 numaralı Ersin AKŞOR tarafından hazırlanan “Bazı Arpa Popülasyonlarında Anter Kültürü Yöntemi İle Double Haploid Bitki Eldesinde Rejenerasyon Oranının Artırılması” adlı bu çalışma 08/01/2024 tarihinde tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda oy birliği / çokluğu ile başarılı bulunarak jürimiz tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Volkan GÜL

Üye : Prof. Dr. Fırat SEFAOĞLU

Üye : Doç. Dr. Erdoğan ÖZTÜRK

Bu tezin kabulü Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun/...../20... tarih ve 20...../.....-..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Doç. Dr. Murat KUL
Enstitü Müdürü

BEYANNAME

Bayburt Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre Doç. Dr. Volkan GÜL danışmanlığında hazırlamış olduğum “Bazı Arpa Popülasyonlarında Anter Kültürü Yöntemi ile Double Haploid Bitki Eldesinde Rejenerasyon Oranının Artırılması” başlıklı yüksek lisans tezimin bilimsel etik değerlere ve kurallara uygun, özgün bir çalışma olduğunu, aksinin tespit edilmesi halinde her türlü yasal yaptırımını kabul edeceğimi beyan ederim.

08.01.2024

Ersin AKŞOR

ÖN SÖZ

Lisansüstü eğitimi boyunca destek ve tecrübelerinden fazlasıyla yararlandığım danışman hocam Sayın Doç. Doktor Volkan GÜL'e, aldığım derslerde gayretle bilgi aktaran hocalarıma, ders arkadaşlarıma teşekkürlerimi ve minnetlerimi sunuyorum.

Yüksek lisans tez savunma sınavındaki değerli jüri üyelerim Sayın Prof. Dr. Erdoğan ÖZTÜRK ve Sayın Doç. Dr. Fırat SEFAOĞLU hocalarıma değerli katkılarından dolayı teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Desteklerini hiç esirgemeyen Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü- Biyoteknoloji Bölümü çalışanlarından mesai arkadaşlarım ve şefim Doktor Gülden ÇETİN ÖZKAN'a, Meryem SAĞKOL'a, Yusuf COŞKUN'a, Ali Aykut TEKİN'e, Doktor Oğuzhan AYDIN'a ve Sefa ÜNAL'a çok teşekkür ederim.

Ayrıca benim okumam için kendinden fedakârlık eden biricik eşime, duası güzel anacığıma, ikinci annem olan ablama, küçük ablama, ağabeyime ve tüm çekirdek aileme sonsuz teşekkür ederim.

Ersin AKŞOR

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI ARPA POPÜLASYONLARINDA ANTER KÜLTÜRÜ YÖNTEMİ İLE DOUBLE HAPLOİD BİTKİ ELDESİNDE REJENERASYON ORANININ ARTIRILMASI

Ersin AKŞOR

Bayburt Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Organik Tarım İşletmeciliği Ana Bilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Volkan GÜL

Bayburt-2024, Sayfa: 49

Bu Araştırma Bazı Arpa Popülasyonlarında Anter Kültürü Yöntemi ile Double Haploid Bitki Eldesinde Rejenerasyon Oranının Artırılması amacıyla 2021 yılında Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü, Biyoteknoloji Araştırma Merkezi, Yenimahalle yerleşkesinde yürütülmüştür. Birbirinden farklı üç melez popülasyonların (Tokak 157-37 (X) Aida (X) Sayım 40, Sayım 40 (X) Tokak 157-37, Cirit (X) Alena) materyal olarak kullanıldığı çalışmamızda, bitki eksplantının (arpa başağının alt-orta-üst kısımlarının), iki farklı sıcaklığın (+4-+28 °C) ve Kübrik Sülfat(CuSO₄) konsantrasyonlarının (kontrol-1-5-10 mg/L) ön muamelede değişkenler olarak ; anter kültürüne, haploid bitki elde edilmesine ve rejenere olmuş bitkilere sayısal olarak etkileri incelenmiştir. Değişken ön muamelelerle birlikte ilk olarak 1 Molar katı Mannitol besi yeri ortamı, sonrasında sırayla kallus oluşturma, kallus geliştirme ve köklendirme besi yerleri kullanılmıştır. Haploid (n kromozom sayısına sahip) anterler steril koşullarda ilk besi yerine aktarıldıktan sonra sırasıyla; kallus (anter ile kallus arası 3-4 hafta kadar sürmektedir), yeşil kallus, sürgün, köklü bitkicik oluşumları gözlenmiştir. Sonrasında Vernelizasyon ihtiyacının karşılanması için +4°C’de 30 gün bekletilmiştir. Kallus oluşumu, sürgün ve rejenere bitki sayıları bakımından melez popülasyonları farklı sonuçlar vermiştir. Bu durum genotiplerin çalışmadaki önemini de ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: Double haploid, Arpa, Eksplant, Kübrik sülfat, CuSO₄, Anter kültürü.

ABSTRACT

M. SC. THESIS

INCREASING THE REGENERATION RATE OF DOUBLED HAPLOID PLANTS BY ANTHER CULTURE METHOD IN SOME BARLEY POPULATIONS

Ersin AKŞOR

Bayburt University

Institute of Graduate Studies

Department of Organic Agriculture Management

Thesis Advisor: Assoc. Prof. Dr. Volkan GÜL

Bayburt-2024, Pages: 49

This research was carried out at the Field Crops Central Research Institute, Biotechnology Research Center, Yenimahalle campus in 2021 with the aim of increasing the regeneration rate in obtaining doubled haploid plants by anther culture method in some barley populations. In our study where three different hybrid populations (Tokak 157-37 (X) Aida (X) Sayım 40, Sayım 40 (X) Tokak 157-37, Javelin (X) Alena) were used as materials, plant explant (lower-middle-upper parts of barley spike), two different temperatures (+4-+28 °C) and Cubic Sulfate (CuSO₄) concentrations (control-1-5-10 mg/L) were used as variables in pretreatment; anther culture, haploid plant production and regenerated plants as variables in pretreatment. With the variable pretreatments, 1 molar of solid mannitol medium was used first, followed by callus formation, callus development, and rooting media, respectively. After haploid anthers (with n chromosome number) were transferred to the first medium under sterile conditions, callus (the interval between anther and callus was 3-4 weeks), green callus, shoot, and rooted plantlet formations were observed, respectively. Afterward, they were kept at +4°C for 30 days to meet the need for vernalization. Hybrid populations gave different results in terms of callus formation, number of shoots, and regenerated plants. This situation also revealed the importance of genotypes in the study.

Keywords: Double haploid, Barley, Explant, Cubic sulfate, CuSO₄, Anther culture.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	III
BEYANNAME	III
ÖN SÖZ	IV
ÖZET	V
ABSTRACT	VI
İÇİNDEKİLER.....	VII
TABLOLAR.....	IX
ŞEKİLLER.....	X
SİMGELER.....	XI
GİRİŞ.....	1
Araştırmanın Amacı	5
Beklentiler	5
Araştırmanın Sınırlılıkları ve Dezavantajları	6
Terim ve Tanımları	6
Anter Kültürü Nedir? Terimsel Olarak Neyi İfade eder?	6
Kallus Nedir?.....	6
Rejenere Bitki Nedir?	6
BİRİNCİ BÖLÜM	7
1. KURAMSAL ÇERÇEVE.....	7
İKİNCİ BÖLÜM	14
2. YÖNTEM	14
2.1. MATERYAL	14
2.2. ARAŞTIRMA YÖNTEMİ	15
2.2.1. Sterilizasyon.....	16
2.2.2. Çalışmanın Temelini Oluşturan Kübrik Sülfat(CuSO ₄) Konsantrasyonlarının Kullanıldığı Ön Muamele Uygulamaları	17
2.2.3. Besi Yeri Ortamının Hazırlanması	19
2.2.4. Anterlerin, Kallus Gelişiminin Sağlandığı Besi Ortamına Aktarılması.....	20
2.2.5. Kallusların Gelişimi ve Gelişen Yeşil Kallusların Rejenerasyon Ortamına Aktarılması.....	22
2.2.6. Kalluslardan Gelişen Bitkiciklerin Köklendirme Ortamına Aktarılması ve Vernalizasyona Tabi Tutulması	24
2.2.7. Aklimatizasyon İşlemleri	25
2.2.8. Ploidi Analiz Cihazı İle Elde Edilen Bitkiciklerin Kromozom Katlanmasının Tespiti	25
2.2.9. Gözlem, Veri ve Ölçümlerin Değerlendirilmesi İle İstatistik Oluşturma	26
2.2.9.1. Başak Sayısı (Adet)	26
2.2.9.2. Anter Sayısı (Adet)	26
2.2.9.3. Kallus Sayısı (Adet).....	26
2.2.9.4. Sürgün Sayısı (Adet).....	27
2.2.9.5. Albino Bitki Sayısı (Adet)	27
2.2.9.6. Rejenerasyona Uğrayan Köklü Yeşil Bitki Sayısı (Adet)	27
2.2.10. Ploidi Analiz Cihazı Ölçümleri.....	27
2.2.11. İstatistiksel Değerlendirme	27

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM.....	28
3. BULGULAR.....	28
3.1. KALLUS VERİ İSTATİSTİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ	28
3.1.1. 1.Melez Popülasyonunda Farklı Sıcaklık Ön Muameleleri, Eksplant ve CuSO ₄ (Küprik Sülfat) Dozlarının Uygulanmasıyla Elde Edilen Kallusların İstatistik Verileri.....	28
3.1.2. 2. Melez Popülasyonunda Farklı Sıcaklık Ön Muameleleri, Eksplant ve CuSO ₄ (Küprik Sülfat) Dozlarının Uygulanmasıyla Elde Edilen Kallusların İstatistik Verileri.....	30
3.1.3. 3.Melez Popülasyonunda Farklı Sıcaklık Ön Muameleleri, Eksplant ve CuSO ₄ (Küprik Sülfat) Dozlarının Uygulanmasıyla Elde Edilen Kallusların İstatistik Verileri.....	31
3.2. SÜRGÜN VERİLERİNİN İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRİLMESİ.....	32
3.2.1. 1.Melez Popülasyonu, Ebriyonik Kalluslardan Sürgün Oluşma İstatistik Verileri	32
3.2.2. 2.Melez Popülasyonu, Ebriyonik Kalluslardan Sürgün Oluşma İstatistik Verileri	33
3.2.3. 3.Melez Popülasyonu, Ebriyonik Kalluslardan Sürgün Oluşma İstatistik Verileri	34
3.3. REJENERE OLMUŞ (BİTKİCİK) BİTKİNİN İSTATİSTİKSEL OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ	35
3.3.1. 1.Melez Popülasyonu Rejenerasyon İstatistik Verileri	35
3.3.2. 2.Melez Popülasyonu Rejenerasyon İstatistik Verileri	36
3.3.3. 3.Melez Popülasyonu Rejenerasyon İstatistik Verileri.....	37
3.4. PLOİDİ ANALİZ CİHAZI İLE ELDE EDİLEN BİTKİCİKLERİN KROMOZOM KATLANMASININ TESPİTİ	38
3.4.1. Çalışmada Kullandığımız Ploidi Cihazı ve Kullanım Talimatı	38
3.4.2. Ploidi Cihazı ve Yöntemin Amacı	38
3.4.3. Ploidi Analizi Verileri.....	38
TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER.....	40
Tartışma.....	40
Sonuç	42
Öneriler.....	43
KAYNAKÇA.....	45
ÖZ GEÇMİŞ	49

TABLÖLER

Tablo 1: Melez popülasyonlarında baba ve ana hat olarak kullanılan arpa çeşitlerinin genel özellikleri	14
Tablo 2: Yürütülen laboratuvar çalışmasına ait deneme düzeni ana yapı şeması	18
Tablo 3: Mikrostock bileşik çözeltisi ve kullanılan miktarlar.	19
Tablo 4: Kasha vd. (2003)'de belirtilen yöntemle göre kullanılan protokol.	21
Tablo 5: 1. melez popülasyonu kallus 'Varyans Analizi'	28
Tablo 6: 1. melez popülasyonu: Kübrik Sülfat, sıcaklık ön muameleleri ve eksplant değişkenlerinin, kallus oluşturma istatistiki verileri tablosu.	29
Tablo 7: 2. melez popülasyonu kallus 'Varyans Analizi'	30
Tablo 8: 2. melez popülasyonu: Kübrik Sülfat, sıcaklık ön muameleleri ve eksplant değişkenlerinin, kallus oluşturma istatistiki verileri tablosu	30
Tablo 9: 3. Melez popülasyonu kallus 'Varyans Analizi'	31
Tablo 10: 3. melez popülasyonu: Kübrik Sülfat, sıcaklık ön muameleleri ve eksplant değişkenlerinin, kallus oluşturma istatistiki verileri tablosu	31
Tablo 11: 1. melez popülasyonu sürgün 'Varyans Analizi'	32
Tablo 12: 1. melez popülasyonundan elde edilen sürgünlerin istatistik verileri tablosu.....	32
Tablo 13: 2. melez popülasyonu sürgün 'Varyans Analizi'	33
Tablo 14: 2. melez popülasyonundan elde edilen sürgünlerin istatistik verileri tablosu.....	33
Tablo 15: 3. melez popülasyonu sürgün 'Varyans Analizi'	34
Tablo 16: 3. melez popülasyonundan elde edilen sürgünlerin istatistik verileri tablosu.....	34
Tablo 17: 1. melez popülasyonu rejenere bitki 'Varyans Analizi'	35
Tablo 18: 1. melez popülasyonundan elde edilen rejenere bitkilerin istatistiksel verileri tablosu.....	35
Tablo 19: 2. melez popülasyonu rejenere bitki 'Varyans Analizi'	36
Tablo 20: 2. melez popülasyonundan elde edilen rejenere bitkilerin istatistiksel verileri tablosu.....	36
Tablo 21: 3. melez popülasyonu rejenere bitki 'Varyans Analizi'.....	37
Tablo 22: 3. melez popülasyonundan elde edilen rejenere bitkilerin istatistiksel verileri tablosu.....	37
Tablo 23: 'Ploidi Analiz' sonuçlarına göre; 1.,2. Ve 3. melez popülasyonlardan elde edilen rejenere bitkilerden spontan kromozom katlanması olmayan 'n' kromozom sayısına sahip (double haploid= 2n) bitkilerin, sayı verileri tablosu.....	39

ŞEKİLLER

Şekil 1: Melez bahçesinden seçilen uygun başak örneklerinin görünümü	15
Şekil 2: Bitki yüzey sterilizasyonu ve steril koşullarda dış yapraklarından arındırılmış arpa bitkisi başağı	16
Şekil 3: Anterlerin steril kabinde dikkatlice besi yerine aktarılması	17
Şekil 4: Ön muamelede kullanılan virgülden sonra 4 basamaklı hassas terazi ve Mannitol. ..	19
Şekil 5: Besi yeri ortamı hazırlanması	20
Şekil 6: Anterlerin, kallus gelişiminin sağlandığı besi ortamları	22
Şekil 7: Çalışmada elde edilen bazı arpa bitkisi kallusları.....	22
Şekil 8: Çalışmada meydana gelen besi yeri kontaminasyonu	23
Şekil 9: a. Yeşile dönmüş büyük kalluslar, b. Yeşil kallusların karanlık saha mikroskop görüntüsü, c. Kallustan sürgüne dönmüş bitkiciklerin besi yeri içeren petrideki görünüşleri	24
Şekil 10: Viyole aktarılmaya hazır, kökü gelişmiş bitkicikler.....	25
Şekil 11: Ploidy Analiz Cihazı'nda kromozom katlanma tespitinin yapılması	26

SİMGELER

°C	: Santigrat Derece
G	: Gram
Ph	: Potansiyel Hidrojen
Mg	: Miligram
L	: Litre
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
M	: Molar
cm	: Santimetre
mm	: Milimetre
%	: Yüzde
Ppm	: Milyonda bir (mikro)
H₂SO₄	: Sülfürik Asit
K₂SO₄	: Potasyum Sülfat
CuSO₄	: Bakır sülfat (Kübrik Sülfat)
HClO₄	: Perklorik Asit
HNO₃	: Nitrik Asit
H₂O	: Su
IBA	: Indol 3 butirik asit
IAA	: Indol 3 asetik asit
ZnSO₄.7H₂O	: Zinc Sülfat-7 sulu
H₃BO₃	: Borik Asit
MnSO₄.H₂O	: Manganez Sülfat
KI	: Potasyum İyodür
CoCl₂.6H₂O	: Kobalt Klorür- 6 Sulu
NaMoO₃.2H₂O	: Sodyum Molibdat
KNO₃	: Potasyum Nitrat
NH₄NO₃	: Amonyum Nitrat
MgSO₄.H₂O	: Magnezyum Sülfat
KH₂PO₄	: Mono Potasyum Fosfat
CaCl₂.2H₂O	: Kalsiyum Klorür
FeNa₂EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit Ferrik Sodyum Salt
FeSO₄.7H₂O	: Demir Sülfat- 7 Sulu

GİRİŞ

Gıda ihtiyacı dünyada yaşam döngüsünün başlamasıyla birlikte vazgeçilmez gereksinim olarak yerini almıştır. Dünya nüfus oranı 2050 yılında takriben %35 civarı artacağı ve 9 milyar insanın üzerine çıkacağı tahmin edilmektedir. Bu da gıdasal üretimin %70'in üzerinde artış göstermesi gerektiği anlamına gelmektedir. Nitekim günümüzde nüfus artışı ile birlikte açlık sorunu önemli bir problem haline gelmiştir. Hayvansal ve bitkisel kökenli gıdalar insan beslenmesinde önemli besin kaynaklarını oluşturmaktadır. Hayvansal kökenli gıdalar üretim azlığına bağlı olarak fiyatlarının yüksek oluşu beslenmede bitkisel kökenli gıdaları vazgeçilmez alternatif ürünler haline getirmiştir. Tüm bu bilgiler ışığında geleceğe yatırım yapmanın en öncelikli grubu olan bitkisel ürünlerden yüksek verim alınabilmesi için yeni bitki çeşidi, yeni üretim kanalları, yeni çalışmalar ve gıdada ülkesel olarak kendine yetebilme kabiliyeti kazanılmalıdır.

Dünya'da ve Türkiye'de ekimi ve üretimi en fazla yapılan bitkisel ürün ise tahıllardır. Ekim alanına göre tahıl ekimi oransal olarak dünyada ortalama %45, ülkemizde ise ortalama %47,5 civarındadır. Kültür bitkilerinin en eskilerinden biri olan arpa, buğdaygiller familyasında arpalar oymağında bulunmaktadır. Latincesi *Hordeum vulgare* L. olan arpa; dünyada 50 milyon ha ekim alanı ve 133,5 milyon ton üretim miktarı ile buğday, mısır ve çeltik bitkilerinden hemen sonra gelmektedir. Ülkemizde ise arpa 7 milyon ton üretim değeri ve dekara 258 kg tane verimi ile buğdaydan sonra ikinci sırada yer almaktadır (TÜİK, 2019; FAO 2020).

Arpa bitkisi tek ve çok yıllık, 45 takson, 32 tür ve genel olarak $2n=14$ kromozomdan oluşmaktadır. Tahıllarda arpa 2,4,6 sıradan oluşabilen ve 5-8 arasında en çok kardeşlenme gösteren bir bitkidir. Ortalama bitki boyu 40-110 cm ve başak uzunlukları ortalama 8-15 cm dir. Tohumları kavuz ve kapçıkla sarılı olup, kavuzlu türlerinde kapçık ile kavuz tanelere yapışık olarak bulunmaktadır. Tanelerin her birinde %10-14 arasında kavuz bulunabilmektedir (Anonim, 2017).

Arpa bitkisi binlerce yıla dayanan ve ülkemizde de çok eski yıllardan beri neredeyse her iklim ve toprak koşullarında yetiştirilebilen, genel olarak hayvan yemi ve malt endüstrisinin ham maddesi olarak kullanılan değerli bir besin maddesidir. Arpa bitkisi yüksek nişasta değerine (%79) sahip, %67 karbonhidrat, %5 selüloz, %10 protein, %2 serbest yağ asitleri, fosfor ve potasyum gibi mineraller, A, B ve E vitaminler, β -glukan ve fenolik bileşenleri içeren zengin bir yem bitkisidir. Ayrıca arpa insan beslenmesinde kullanılan ekmek ve unlu mamul üretiminde buğday ve çavdardan sonra büyük paya sahiptir (Kün 1996; Alkan ve Kandemir, 2015).

Dünyada arpa yetiştiriciliğine ait son 5 yıllık veriler değerlendirildiğinde 2018-2019 yıllarında ekim alanı ortalama 49 milyon ha ve üretim miktarı ortalama 140 milyon ton iken, 2019-2020 yılında ekim alanı ortalama 53 milyon ha ve üretim miktarı 158 milyon ton olarak gerçekleşmiştir. Bu yıldan itibaren ekim alanında meydana gelen düşüşler ile birlikte 2022-2023 yılında ortalama ekim alanı 48 milyon ha ve ortalama üretim miktarı 146 milyon ton olarak gerçekleşmiş olup, 2019-2020 yılına göre ortalama %9,43 daralma göstermiştir. Bunun nedeni Rusya, Kazakistan, Avustralya, Türkiye ve AB'deki ekim alanlarının azalmasından kaynaklanmaktadır. Dünyada en yüksek üretim payı (%35) ile Avrupa Birliği ülkelerinden Fransa, Almanya ve İspanya ilk sırada yer almaktadır. Bu üretim payını sırasıyla Rusya (%13) ve Avustralya (%6) takip etmektedir. Ülkemiz ise ortalama dünya arpa üretiminin %6'lık kısmını karşılayabilmektedir (FAO, 2020; USDA, 2022).

Türkiye'de en fazla üretimi yapılan tahıl bitkisi buğdaydan sonra ikinci sırada yer alan arpa yetiştiriciliğine ait son 5 yıllık verilere göre; 2018 yılında ekim alanı ortalama 26 milyon da ve üretim miktarı ortalama 7 milyon ton iken, 2020 yılında ekim alanı ortalama 31 milyon da ve üretim miktarı ortalama 8,3 milyon ton olarak en yüksek seviyesine ulaşmıştır. Arpa ekim alanı 2020 yılına oranla 2021 yılında ortalama %2,3 artış göstermesine rağmen, yaşanan kuraklık nedeniyle bir önceki yıla göre %30,7 azalışla 5,8 milyon tona gerilemiştir. Arpa üretimi ülkemizin hemen her bölgesinde yapılmakla birlikte en fazla üretim sırasıyla İç Anadolu, Ege ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerimizde yapılmaktadır. Bu bölgelerimizde ise en fazla üretim Konya (%12,28) ve Ankara (%9,21) illerinde gerçekleştirilmektedir (TUİK, 2022).

Genetik özelliklerden fayda sağlayarak bitki türü, çeşidi ve cinslerinin genetik karakterini tüketici ve üretici isteklerine bakılarak planlanmış şekilde geliştirme ve değiştirmeye "Bitki Islahı" denilmektedir. Bitki ıslahçıların üzerinde durduğu önemli konularda melezleme, seleksiyon vb. yöntemler ile mutasyon ve poliploid yardımıyla invitro veya invivo bitkiler oluşturularak toprak ve iklim isteklerine göre hastalığa ve bitki zararlılarına daha dayanıklı, verimi yüksek, çevre koşullara toleransı yüksek bitkiler geliştirerek dünya tarımına büyük katkılar sağlamaktır (Şehirli ve Özgen 1988). Ancak yüksek verim potansiyeline sahip, kaliteli ve hastalıklara dayanıklı çeşitler farklı ekolojik koşullarda bu üstün özelliklerini koruyamamaktadır (Yıldırım ve ark., 2007). Geliştirilen yüksek verimli çeşitler en iyi girdi tarım sistemleri altında üretildiği için düşük girdili şartlarında iyi performans gösterememektedir (Fess, Kotchouk ve Beneditto, 2011). Son yıllarda makineleşen ekim, bakım ve hasat işlemleri sayesinde aynı kalitede ürün elde edildiği için saf çeşit kullanımı yaygın hale gelmiştir. Saf çeşit kullanımı hastalık, zararlı ve yabancı otlara karşı duyarlı olduğu için insektisit, herbisit, kimyevi gübre ve büyüme düzenleyicileri gereğinden fazla kullanılmaya

başlanmıştır (Browning, 1988; Wolfe, 2001). Bu tarz olumsuzlukları ve yeni çeşitlerin geliştirilmesinde gerekli olan finansal kaynak, zaman ve emeği en aza indirebilmek için genetik çeşitlilik elde etme yollarından birisi olan çeşit karışımlarının kullanılması gerekmektedir (Lopez ve Mundt, 2000). Seçilen bir çevrede muhtemel değişiklikler göz önünde tutularak yapılacak çeşit karışımları ile verim kayıplarını düşürmek mümkün görülmektedir (Yıldırım ve ark., 2007). Çeşit karışımlarının kullanımı stabilite sağlamanın yanında hastalık ve zararlıların etkilerini düşürmede (Finckh ve Mundt, 1992; Akanda ve Mundt, 1996; Finckh ve ark., 2000), su ve besin maddesi gibi sınırlı kaynakların kullanımını en üst düzeye çıkarmada, topraküstü biokütle üretimini ve organik madde seviyesini artırmada potansiyel bir araç olarak gösterilmiştir (Smithson ve Lenne, 1996; Sarandon ve Sarandon, 1995; Kiaer ve ark., 2009).

Arpanın kültür ıslahının temelini *Hordeum vulgare* L. subsp. Spontaneum'un gerçekleştirildiği tahmin edilmektedir (Pandey, 2006). Yabani arpa olan *Hordeum vulgare* L. subsp. spontaneum Güneybatı Asya orjinli olup, ortalama 5,5 milyon yıl önce Doğu Akdeniz, Balkanlar, Kuzey Afrika, Orta Asya ve Tibet'e kadar dağılım göstermiştir (Nevo, 2012). Yabani formu olan *Hordeum spontaneum*, kültürü yapılmış olan arpa çeşitlerine göre daha fazla farklı genetiğe sahiptir. Yaprak pası, külleme gibi hastalıklara karşı dayanıklı olan yabani formun özelliklerini kültüre alınmış formlara genetik olarak aktarıp hem dayanıklı hem de verimi yüksek çeşitlerin geliştirilmesi Klasik Islah'ın amaçlarından bir tanesi dir. Doğal olarak bu gen yapısı ve istekleri bilinerek klasik ıslah metoduyla dayanıklı ve verimi yüksek çeşitler geliştirilebildiği gibi "Bitki Doku Kültürü" yöntemiyle de virüsten ari ve hızlı bir şekilde invitro koşullarda bitki çeşidi geliştirmek ve gen yapısını düzenlemek mümkündür. Bitki doku kültürü; mikroptan arındırılmış durumda, sentetik besi yerlerinde, bitkinin tümü, hücre (meristem ve kallus hücreleri), doku (bitkinin çeşitli kısımları) ile organ (meristem ucu, kök) vb. kısımlardan tekrardan hücre, hücre yığınları, yeni bitki veya metabolit oluşturulmasıdır. Doku kültürü sayesinde çelikleme veya tohumdan çoğaltılamayan ıslah edilmiş üstün özellik gösteren bitkilerden çok sayıda yeni nesillerin ortaya konulması için yapılan işleme mikro çoğaltım denilmektedir. Doku kültürü ya da mikro çoğaltım yöntemi çok hücreli bir canlı organizmanın her hücresinin uygun şartlar altında virüsten arındırarak gelişme kapasitesine sahip olması olarak 1838 ve 1939 yıllarında Schleiden ve Schwann tarafından totipotens teorisi olarak ifade edilmiştir. Bitki çeşit gelişimi ve eldeki çeşitlerde genetik çeşitliliğe gitmek bitki doku kültürünün esas amaçlarındanıdır. Tüm bunlardan yola çıkarak bitki doku kültür çalışmaları bitkinin genetiğinin amaca yönelik geliştirilmesinde çok önemlidir. Kaybolmaya yüz tutmuş bitki çeşitlerinin korunumunda ve üretilmesi-çoğaltılması güç bitkilerin

devamlılığında, farklı doku kültür çalışmaları sürekli kullanılabilmektedir (Srivastava, 1981; Kaya, 1988).

Haploid bitkiler ya embriyo kesesindeki haploid dokuların normalde yumurta hücresinin uyarılması sayesinde dişi gametten ya da polen rejenerasyonu ile erkek gametten *in vitro* koşullarda bitki oluşumundan elde edilmektedir. Her iki yoldan da haploid oluşumu, doğada kendiliğinden ortaya çıkabilmektedir. Doğal partenogenezis veya polen embriyogenezisi yollarının her ikisi de ıslah programları için gereksinim duyulan haploid bitkileri sağlayabilmekten çok uzaktır. Bu nedenle haploid üretim yöntemleri geliştirilmiştir. Haploid bitki elde etmek için yapılan yöntemlerden biri olan anter kültürü; içerisinde olgunlaşma olmamış polenleri (mikrosporları) ihtiva eden anterlerin, *in vitro* koşullarda tomurcuklardan ayrılarak yapay besi yeri ortamlarına aktarılması ve sonrasında haploid embriyolar elde edilmesin verilen isimdir. Anter kültüründe ilk amaçlardan birisi çok kısa sürede F7 seviyesinde %100'e yakın saf bir hat elde etmektir. Genetik açılmanın olmadığı bu yöntemle çok kısa sürede çeşit geliştirmeye gidilebilmektedir (Bhojwani,1983). Anter kültürü, günümüzde dihaploid (DH) bitkilerin elde edilmesinde yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Bu tekniğin diğer *in vitro* DH bitki elde etme tekniklerine göre avantajı; bir anter içerisinde binlerce mikro sporun bulunması ve uygun bir *in vitro* kültür sistemi ortaya konabildiğinde bir anterden çok sayıda DH bitki elde edilmesidir. Dihaploid tekniği ile tam bir homozigoti çok kısa sürede elde etmek mümkündür ve resesif mutasyonların açığa çıkartılmasında başvurulacak en etkin yöntemlerden bir tanesidir. Haploidler ve bunların katlanması ile geliştirilen dihaploidler; sitolojik, fizyolojik ve genetik açıdan önemli deneysel materyallerdir. Çift haploid bitkiler, farklı patojenlere karşı *in vitro* seviyede seçime olanak vermekte, hastalıklara dayanıklılık çalışmalarında yer, zaman ve maddi kazanç sağlamaktadır (Vidalie, 1986; Salantur A. 2011).

Bununla birlikte, bitki doku kültürünün amaçlarından biri de olan virüs ve hastalıktan arındırılmış bitki almak ve bu bitkileri iklim odaları veya fotoperiyod özellikli dolaplar ile kısa sürede toprağa alıştırma, sonrasında iklim isteklerine uyum sağlayacak seralarda çevre koşullarından etkilenmeden bitki yetiştirme olanağı da bulunmaktadır. Özellikle Fizyolojik, morfolojik ve genetik açıdan büyük çeşitlilik göstermesi, geniş ölçüde genetik stokların ve haritaların bulunması ve kendi kendine döllenebilmesi sayesinde çok yönlü testlerin uygulanabilmesi, arpanın fizyolojik ve moleküler çalışmalar için önemini daha da arttırmaktadır. Bu nedenle arpada, uzun ve uğraşı gerektiren saflaştırma süreci ve sonrasında elde edilmesi istenen %100 homozigot genotipler için uygulanan bir metot olan anter kültürü

yöntemi ile double haploid bitki eldesinde rejenerasyon oranının artırılması amaçlanmaktadır. (Özkan G. 2017).

Avrupa ülkelerinde üretimi yapılan arpa çeşitlerinin yaklaşık %50 kadarı, haploid bitki üretim tekniğiyle geliştirilmiş olan çeşitlerdir (Foster vd. 2009). Tahıllar gurubunda, anterden bitki doku kültürü yönteminde bazı problemler olabilmektedir. Bunlardan en önemli olanı; genotip farklılıklarının tahıllarda anter kültüründe farklı reaksiyonlarda sonuç vermesidir. Bitki yetiştirme şartları, mikrospor zamanı, kültüre alınacak olan anterlerin kültüre alınmadan önce ve sonrasında düşük sıcaklıkta bulunması gibi faktörler anter kültürünü etkileyebilmektedir (Fadel ve Wenzel 1990; Yıldırım vd. 1990; Flehinghaus vd. 1991; Hatipoğlu ve Genç 1992; Daniel 1993; Immonen 1999; Dağüstü 2002).

Araştırmanın Amacı

Yabancı dölleme oranı olarak çok az olan arpa bitkisinde, bitki doku kültürü yöntemlerinden biri olan, haploid bitki üretimi tekniklerinden, anter kültür yöntemiyle androgenes verimliliğini artırarak albino bitkilerin önüne geçmek için belirli oranlardaki kübrük sülfatı uygulayarak double haploid bitki oluşumunu gerçekleştirerek gereken uğraş ve zamanı minimize ederek sadece birkaç ay kadar kısa sürede %100'e yakın homozigot ve saf hat elde etmektir. Kallus ön muamelesi olarak farklı dozlarda uygulanan CuSO_4 ile kallus sayısının fazla olması, albino bitkinin oluşmaması ve en sonunda rejenere olmuş bitki sayısının, CuSO_4 kullanılmayanlara oranla daha fazla olması, hedeflenmektedir. Daha önce yapılmış ve büyük ölçüde başarı sağlanmış çalışmalarda karşılaşılan en büyük sorun albino bitki oluşumu ve anterden kallusa geçiş aşamasındaki aksilikler oluşturmıştır. Bu sebepleri en aza indirmek için Kübrük Sülfat (CuSO_4), arpada anter kültüründe kullanılmıştır. Çalışmada belirli oranlardaki Kübrük Sülfatı, ilk ön stres muamele ortamına koyarak etkileri gözlemlenmiştir. Bunun için başaklardaki kallus yapma gücü zayıf olan alttan 4 sıra, üstten 4 sıra ve orta kısım olmak üzere başakları üç bölüme ayrı ayrı etkileri gözlemlenmiştir. Yine bununla birlikte farklı grupları farklı sıcaklıklar olacak şekilde tekrar gruplandırarak, sıcaklığın etkilerine de bakılarak en doğru sonuca ulaşmak için deneyler kurulmuştur.

Beklentiler

Rejenere olmuş tam bir bitkinin ($2n$ =diploid) elde edilmesi, anter kültürü yöntemiyle elde edilen bitkilerin sayısının oransal olarak yükseltilmesi, çalışmanın olumsuz etkilerinden biri olan kontaminasyonun ve albino bitki sayısının en aza indirilmesiyle birlikte yapılan çalışmanın protokolünün bir sonraki çalışmalarda kullanılabilir boyuta taşınması beklenilmektedir.

Araştırmanın Sınırlılıkları ve Dezavantajları

Olumlu yönleri yanında bitki doku kültür çalışmalarının dezavantajlı durumları da bulunmaktadır. Başta arpa bitkisinde olmak üzere diğer tahıl ürünlerinde de geri dönüşümü olamayan albino bitkiler oluşabilmektedir. Albinolar tohum bağlama ve gelişme kabiliyetine sahip değildirler. Ayrıca tüm genotiplere doku kültürü uygulaması yapmak oldukça güçtür. Başlıca sebebi daha önce çalışılmamış veya endemik bitki türleri ile yabancı bitki genotiplerini önce tanımlayıp sonra o bitkiye göre laboratuvar çalışması optimize etmek gerekmektedir. Besi yeri protokolünü optimize etmek sanıldığı gibi kolay bir iş olmamakla birlikte ciddi uzmanlık gerektirmektedir.

Terimler ve Tanımları

Anter Kültürü Nedir? Terimsel Olarak Neyi İfade Eder?

1953 yılında ilk defa Tulecke, *Ginkgo biloba* bitkisinin olgunlaşmış polenlerinden, kültür şartları dahilinde haploid bir kallus oluşumu için uyarılabileceğini belirlemiştir. İlk önemli gelişmeyi 1964 yılında Maheshwari ve Guha gerçekleştirmiş, kültüre alınan *Datura innoxia* bitkisinin anterlerinde mikrosporlardan haploid sayıda embriyo oluşturulmuştur (Guha, & Maheshwari, 1966). Esasen anter kültürü; içerisinde olgunlaşma olmamış polenleri (mikrosporları) ihtiva eden anterlerin, *in vitro* koşullarında tomurcuklardan ayrılarak yapay besi yeri ortamlarına aktarılması ve sonrasında haploid embriyolar elde edilmesi olarak tanımlanmaktadır. Henüz olgunluğa ulaşmamış ve içerisinde birinci polen mitozu evresine gelmiş tek çekirdekli mikrosporları barındıran anterler, anter kültürü başlangıcı için uygun bir materyal olduğu söylenebilir.

Kallus Nedir?

Kallus, kelime anlamı olarak düzensiz hücre yığılmaları anlamına gelmektedir. Anter kültürü çalışmasında ise bitkilerde erkek üreme organı olan anterlerin çeşitli kimyasal ve hormon ilaveli uygun besi yeri ortamlarında hücrelerin farklılaşarak kütleli olarak çoğalmasıyla meydana gelen yapılardır. Arpa bitkisi yapı itibarıyla başaktaki her bir boğumdaki zarlı yapı içinde 3'er adet anter bulunmaktadır.

Rejenere Bitki Nedir?

Doku kültürü yöntemiyle elde edilen bitkiciklere denmektedir. Sırasıyla elde ettiğimiz; anter, kallus, yeşil kallus, sürgün yapılarından sonra meydana gelen köklü sürgünlere rejenere olmuş (rejenerasyona uğramış) bitki denmektedir.

BİRİNCİ BÖLÜM

1. KURAMSAL ÇERÇEVE

İnsan beslenmesinde temel gıda maddelerinin başında tahıllar gelmektedir. Nitekim, İnsanoğlu yerleşik hayata geçtiği dönemlerde arpa bitkisi ilk kültüre aldığı tahıl bitkileri arasında yer almaktadır. Arpa bitkisi ülkemizde buğdaydan sonra en fazla üretimi yapılan tahıl ürünlerinden bir tanesidir. Günümüzde iklim, çevre, hastalık, toprak yapısı gibi birçok faktörlere karşı dayanıklı, yüksek tohum verimi ve malt üretimi sağlayan kaliteli arpa çeşitleri elde etmek için birçok ıslah çalışmaları yürütülmektedir. Bu tarz ıslah çalışmaları birebirde uzun zaman ve uğraşı gerektirmektedir. Yapılan çalışmada; bu sürenin kısaltılması amacı ile anter kültürü metotları entegre edilerek double haploid bitki teknikleri kullanılarak kısa sürede saflaştırma işlemi gerçekleştirilerek yeniden 2n kromozom sayısına sahip tohum oluşturabilme kabiliyeti olan %100 homozigot saf hat bitkiler elde edilmeye çalışılmıştır.

Anter kültürü yöntemi ile arpa bitkisinden elde edilen haploid bitki ve üretimi bakımından bitkinin orta kısmında bulunan başakcıklardan alınan erkek organları (anter) daha iyi sonuç vermektedir (Huang ve Sunderland, 1982; Powell 1988).

Knudsen vd. (1989), farklı arpa popülasyonlarından seçilen donör bitkilerinden alınan anterlerin yeşil rejenerasyona yönelme oranı arazide yetiştirilen donör bitkilerinde % 22,80 iken, iklim odası veya serada yetiştirilen donör bitkilerinde %14,30 olarak belirlenmiştir.

Roberts-Oehlschlager ve Dunwell (1990), farklı ön muamele uygulamalarının incelendiği araştırmada, 0.3 Mol mannitol ortamında iki hafta süresince +4 °C’de bekletilen anterlerin, 25 °C’de 4 gün bekletilen anterlere oranla daha az tepkime verdiği ve ön uygulama sonrasında yeşil bitkiye dönme oranının arttığını tespit etmişlerdir.

Szarejko ve Kasha (1991), farklı arpa popülasyon, çeşit ve hatlarından ön muamele uygulaması için alınan anterlere sırasıyla 0-7-14-21-28 gün süre ile +4 °C’ye maruz bırakma sonucu, 14 gün +4 °C’de bekletmek diğerlerine oranla daha iyi bir başarı gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Cistué vd. (1994), tarafından farklı ön muamele uygulamalarının etkilerinin araştırıldığı arpa anter kültürü çalışmasında, litrede 8 gram agarla karıştırılan 0,7 mannitollü besi yeri ortamına alınan arpa anterlerinin, albino bitki oluşumunun azlığı bakımında ve yeşil sürgün gelişiminde daha başarılı olduğu tespit edilmiştir.

Lezin vd. (1996), farklı genotipteki arpaların kullanıldığı çalışmada, yeşil bitki oluşturmaları bakımından 14 gün kadar sürede +4 °C’de bekletilen anterlerde olumlu dönüşler olduğu gözlemlenmiştir.

Çeliktaş ve Hatipoğlu (1997), tarafından yapılan arpa anter kültürü çalışmasında, 14,400 anter kültüre alınmış, tüm varyantlarda ortalama %0,27 civarında tepki gözlemlenmiş ve genotiplere göre %0 ila %1,3 civarında bir değişkenlik olduğu saptanmıştır.

Savaşkan vd. (1999), anter kültürünün hangi çeşitlerde ne kadar etkili olduğunu araştırmak için dört adet arpa çeşidi (Anadolu, Cumhuriyet-50, Obruk-86 ve Tokak-157/37 çeşitleri), FHG ve BAC3 kültür ortamları kullanılarak 21 gün soğukta (+4) bekletmeli ön muamele yönteminin etkileri araştırmak için yapılan çalışmada; BAC3 ortamının daha başarılı olduğu, bu besi yerinde kallus miktarı Tokak-157/37 çeşidinde ortalama %98, Cumhuriyet-50 çeşidinde ortalama % 75, Anadolu çeşidinde ortalama %40,4 ve Obruk-86 çeşidinde ise ortalama %34,5 olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu ortamda tüm çeşitlerde bitki rejenerasyonu olmuş ve yeşil bitki üretimi bakımından Cumhuriyet-50 çeşidi en iyi sonucu verdiği belirlenmiştir.

Farklı ön muamele ortamının (3 adet) anter kültür çalışmalarına etkisinin araştırılması için biri angrogenik özelliği yüksek olan İngiliz Igri çeşidi olmak üzere toplam üç adet çeşit üzerinde yapılan çalışmada; mannitolsüz (4 °C’de 28 gün) ve 0.3 M mannitol (25 ve 4 °C’de 4 gün) yoğunluğunda uygulanan yöntemlerden mannitolsüz 4 °C 28 gün bekletilen anterlerin kallus yapma kabiliyetlerinin daha iyi olduğu ve mannitol uygulanan metotta ise yeşil sürgün veren bitkicik sayısında artış olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca hem mannitol hem de soğuk uygulama diğerlerine kıyasla etkisiz olmuştur (Kruczkowska vd., 2002).

Jacquard vd. (2006), arpa bitkisinde anter kültüründe yeşil bitki oluşumu ve albinizme neden olabilecek faktörlerden, yıllık döngü ve anter ile başak pozisyonlarının etkilerini araştırdıkları çalışmada; Igri (kışlık çeşit) ile Cork (yazlık çeşit) materyal olarak kullanılmıştır. Çeşitlerden şubat ve temmuz aylarında alınan anterlerde, ağustos ve aralık aylarında alınındakine göre daha çok rejenerant bitki alınmıştır. Albino bitki oranları aynı olmuştur. Anterlerin alındığı ana başak veyahut dördüncü kardeş başağından alınmasına göre farklı sonuçlar vermiştir. Igri %76.6 oranından 31’e, Cork çeşidi %58’den 32’ye düşmüştür. Bu sonuçlar neticesinde anter kültürü çalışmasında genotipin etkisi de gözlemlenmiştir.

Zhao ve ark. (2010), biber bitkisi anterinden yapılan anter kültüründe büyüme düzenleyicileri ile karbon kaynaklarının etkileri araştırılmıştır. Kallus oluşturma bakımından

2,4-D en iyi ve 6-BA en zayıf olacak şekilde sonuçlar alınmıştır. Embriyo bakımından ise yine aynı benzer sonuçlar alınmıştır. ZT, NAA, KT ise sırasıyla en iyiden kötüye doğru sıralanmıştır. Maltoz karbon kaynağı olarak sakaroza göre daha başarılı olmuştur. En iyi sonuçlar %3 ila 6 arasında hazırlanan dozlardan elde edilmiştir.

Cistue' vd. (2011), dihaploid bitki eldesi için erkek ile dişi gametlerle çalışılmış ve arpa çeşidi olarak Oregon Wolfe kullanılmış olup, karşılaştırmalı haritalama çalışmaları yapmıştır. Önceki çalışmalar dişi gametten yararlanarak yapılan *Hordeum bulbosum* yöntemine dayanmaktaydı. Bu çalışma erkek gametli bir yöntem olmuştur. Her iki alt popülasyon için 1328 tek nükleotid polimorfik bağlantıların kullanıldığı haritalar oluşturulmuştur. Lokus sıralaması farksız çıkmıştır. Anter kültüründe alt popülasyonlarda daha büyük bir açılma olmuştur.

Kahrız vd. (2011), Bu çalışma 2mg/litre 2,4-D, 90mg/litre sukroz ve 0.1mg/litre Kinetin içeren katı FHG besi yeri ortamı üzerinde, 12 adet kışlık İran arpa çeşidinin anter kültürüne tepkisini belirlemek için yapılmıştır. İlk muamele uygulamasında soğuklanma için, çalışmada kullanılan her bir çeşidin başaklarını 14 gün ve 4°C'de bekletilmiştir. Embriyogenez ve yeşil yapraklı bitki oluşumu bakımından hepsi olumlu sonuçlar verirken, 9 numaralı genotip en iyi sonucu vermiştir.

Lazaridou vd. (2011), yüksek ve düşük verimli F2 arpa popülasyonlarından alınan anterlerin in vitro kültüre olan tepkileri araştırılmıştır. Toplanan başaklar 4°C'de 28 gün ön muameleye alındıktan sonra anterler FHG besi yeri ortamına aktarılmıştır. Farklı 60 F2 popülasyonu kullanılan çalışmada 39 popülasyona ait anter, anter kültürüne cevap vermiş olup, bu anterlerden 15 tanesinde yeşil bitki oluşumu belirlenmiştir ve tohum bağlamış %72,7 fertil bitki oluşmuştur. Yüksek verimli olanlardan elde edilen anterlerden, düşük verimli olanlara göre daha fazla yeşil bitki oluşmuştur. Sonuç olarak verim kapasitesi ile anter kültürüne tepki bakımından artı yönlü pozitif bir korelasyon elde edilmiştir.

Taşkın ve ark. (2011), biber bitkisinden alınan anterlerden yapılan anter kültürü çalışmasında genotip çeşitliliğinin, anter alma dönemindeki farklılıkların ve besi yeri ortamların etkileri araştırılmıştır. En iyi sonuçlar düşük sıcaklık toleransı olan genotipte sağlandığı ve anter alma dönemi bakımından en iyi dönemin Nisan-Mayıs ayları olduğu belirlenmiştir. Absisik asitin olgunlaşmamış embriyolara etkisinin olmadığı sonucuna ulaşılmıştır.

Ata (2011), biber bitkisinden alınan anterler ile yapılan anter kültürü araştırmasında, farklı dozlardaki BAP kullanımı, düşük ve yüksek sıcaklık toleranslara sahip farklı genotipler ve kültüre alma zamanları değişkenlerinin anter kültürüne etkisi incelenmiştir. Şubat, mayıs,

ağustos ve ekim aylarında alınan anterler dapi ve mikrospor boyama yöntemlerinden asetokarmen boyama ile mikrosporlar boyanmıştır. Nisan ve ağustos aylarında kültüre alınan anterler daha başarılı olduğu belirlenmiştir.

Salantur ve ark. (2011), F2 kademesindeki kışlık bazı ekmeklik buğday popülasyonlarından alınan anterlerin materyel olarak kullanıldığı anter kültür yöntemi çalışmasında, bitki rejenerasyonuna olan tepkiler çalışılmıştır. Nihai sonucunda doublehaploid bitki eldesi, 15 popülayondan elde edilmiştir. Sadece kallus oluşumu 4 popülasyonda olmasına karşın 2 popülasyonda anterler hiçbir tepki vermemiştir.

Al-Ashkar (2013), tarafından yapılan çalışmada 4 tanesi F1 melezi olmak üzere toplam 5 farklı genotip buğdayın tuza dayanıklılık ile hassasiyeti ve anter kültürüne karşı verdiği tepkiye, 4 çeşit besi yeri ortamında bakılmıştır. Genotiplerde varyasyonlar tespit edilmiş ve yeşile dönen bitkicik oranı %2,4 ile %5,4 arasında iken kallusda bu oran %4,6 ve %9,4 civarı arasında bulunmuştur. Sürgün sayısındaki artış bakımından NaCl içermeyen besin ortamı, içerece kıyasla daha başarısız bulunmuştur.

Gradula vd. (2014), anter kültürü yöntemi çalışmasında materyal olarak Letonya'da kullanılan arpa, birkaç tahıl ve yazlık ile kışlık buğday çeşitleri kullanılmış ve double haploid bitki amaçlamışlardır. Hem arpa hem de buğday kallus geliştirme ortamlarına 2,5 mg/l eklenen bakırın, yeşil bitki bakımından daha başarılı sonuçlar verdiği bildirilmiştir. Çalışmanın sonuç verileri olarak; yazlık buğday melezleri, kışlıklara oranla daha fazla embriyogenez oluşturmuştur. Tritikale ve arpa bitkilerinde, albino bitki eldesi oranı ise düşmüştür.

Ghasemporu vd. (2014), yapılan çalışmada materyel olarak aspir bitkisi kullanılmış olup laboratuvar ortamında farklı koşullarda elde edilen sürgün, yaprak ve köklerden kallus oluşumu, geliştirme ve köklendirme metotları incelenmiştir. İlk önce tohumlar MS ortamına alınmış, farklı dozlardaki BAP, NAA, 2,4-D ve kinetin içeren MS ortamlarına aktarılmıştır. 1 mg BAP olan ortamda kallus oluşumu açısından %98 civarında başarılı olmuştur. Rejenerasyon oranının en yüksek olduğu ortam 0,1 mg NAA ve 1 mg BAP içeren MS ortamları olmuştur.

Mihaly ve ark. (2014), anter kültür yöntemi çalışmasında, yulaf bitkisinde laboratuvar koşullarında yeşil bitki rejenerasyon miktarını arttırmak için, anterleri soğuk ön muameleye maruz bırakıp, çeşitli bitki büyüme düzenleyici hormonlarının farklı konsantrasyonlarını kullanarak 2n kromozoma sahip bitki elde etmişlerdir.

Begona ve Cistue (2015), anter kültüründe ön muamele esnasında DMSO konularak androgenetik etkinin arttırılması amacıyla ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.) ve arpa bitkilerini kullanmışlardır. DMSO membran geçirgenliği arttırır ve zar akışkanlığını azaltır.

Faklı Konsantrasyonlarda denemeler kurulmuştur. Standart, %0,0. 2,%1 ve %2 değişkenlerde kurulan denemelerde arpa bitkisi için yapılan anter kültüründe 0,7 M Mannitol, 40 mM CaCl₂.H₂O, %8 SeaPlaque agaroz ilaveli katı besin ortamı kullanılmıştır. 24 °C – 4 gün karanlık inkübatörde beklettikten sonra 1.5 ml Ficoll200 ihtiva eden FHG besi yeri ortamına aktarılmıştır. Kallusların gelişmesi için 10 gün sonra Ficoll400 olan besin ortamına alınmıştır. Daha sonra yeşil sürgün oluşumu için bir diğer ortam olan 2mg/l NAA itiva eden MS ortamına aktarılmıştır. Yapılan çalışmada %1’lik DMSO olan yöntem en iyi sonucu vermiştir. Toksidite nedeniyle %2 oan uygulama ise olumsuz sonuçlanmıştır.

Sriskandarajah vd. (2015), arpada yapılan anter kültürü araştırmalarında, büyük sorun teşkil eden albino bitki oluşumunu incelenmiştir. Kültür şartlarının iyileştirildiği yazlık arpa bitkisinde yeşil bitki oluşum oranı %6 seviyesinden %42’ye arttırıldığı gözlemlenmiştir. Optimize edilmiş protokolde, rejenerasyon besi ortamına kazein hidrolizat eklenmiş ve yeşile dönen bitki sayısında artış olduğunu belirlenmiştir. Ayrıca standart besi yerine kıyasla, embriyo için kullanılan köklendirme ve sürgün ortamı daha başarılı sonuçlar vermiştir.

Diker ve Şan (2016) bazı bitki büyüme düzenleyicileri konsantrasyonlarının kullanıldığı çalışmada, Rosalin Gerbera çeşidinin yaprak ve yaprak sapı eksplantaları materyal olarak kullanılıp, büyüme düzenleyici hormonların etkileri araştırılmıştır. İki eksplanttan oluşan kalluslar TDZ, BAP’a göre daha başarılı sonuç vermiştir. Yaprak sapı, eksplant olarak daha başarılı olurken, çalışmada kullanılan gümüş nitrat ise sürgün oluşumunda başarılı olamamıştır.

Özkan (2017), yabani arpa ve 5 tescilli arpa çeşidini materyel olarak kullandığı çalışmada, anter kültürü yöntemiyle yeşil bitki sayısını invitro yani laboratuvar koşullarda arttırmak amaçlanmıştır. İlk başlangıcı serada melezleme yaparak başlanan çalışmada sonrasında doku kültürü anter yöntemi denemeleri olmuştur. Bu çalışma ile 0,7-0,3 Molar olmak üzere 2 farklı mannitol ve +4 °C/21 gün süresince anterlerin bekletildiği bir ön muamele kombinasyonu yapılmıştır. En başarılı uygulama 0,7 M mannitol uygulanan deneme olmuştur. Çalışma sonucunda 316 adet rejenere olmuş, DH (2n kromozom sayısına sahip double haploid) bitki elde edilmiştir.

Rezaei vd. (2018), doku kültürü çalışmasında, içerisinde vitamin, mineral tuzu %0,7, agar ve %3 sukroz olan MS besi yeri ortamı kullanılmıştır. Materyel olarak çörek otu bitkisinin kodiledon ve hipokotil ekplantları kullanılmıştır. Bitki büyüme hormonlarından TDZ, BAP, NAA ve kinetin kullanılmış ve hormonların etkileri araştırılmıştır. En iyi kallus gelişimi kotiledondan 0,05 mg NAA ve 1 mg BAP hormonlarının birlikte kullanılmasıyla elde edilmiştir.

Birecikli ve Akbaş (2018), araştırmasında, aspir çeşitlerinden linoleik özelliklere sahip Balcı çeşidi kullanılmış ve sitokin ve oksin hormonlarının mikro çoğaltım ve köklendirmeye etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada materyal olarak steril koşullarda çimlendirilmiş tohumlardan elde edilen sürgün uçları kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonlara sahip BAP içeren MS besi yeri ortamları kullanılmıştır. Mikro çoğaltım için, Balcı çeşidinde sürgün çoğaltımında en iyi ortam litrede 0,5 mg kinetin olan MS besi yeri ortamı iken, en iyi köklenme ortamı ise 2,0 mg/litre NAA da görülmüştür.

Asadi vd. (2018), tarafından hıyar bitkisinde yapılan anter kültürü çalışmasında iki farklı çeşit (genotip) kullanılmıştır. Çalışmada +4°C de bekletilen steril tohumlar kullanılmıştır. Hormonlardan 2,4-D ve BAP kombinasyonları içeren MS besi yeri ortamlarında 35°C’de bekletilen anterlerden, double haploid bitkiye dönüşecek kalluslar oluşturmak için uygulamalar yapılmıştır. Çalışma sonunda kromozom sayısı katlanmış DH bitki oranı %81 olarak belirtilmiştir.

Hooghvorst vd. (2018), çeltik anterinin kullanıldığı anter kültürü çalışmasında double haploid bitki elde etmek için kullanılan çalışma protokolünün geliştirilmesi için, iki farklı genotip, üç büyüme düzenleyici hormon kombinasyonu ve birbirinden farklı dört kolhisin uygulaması yapılmıştır. 10 °C’de 9 gün ön muameleye tabi olan genotipde kallus oluşumu 50 kat kadar arttığı gözlemlenmiştir. Kolhisin içeren besi yeri ortamında, haploid bitki sayısının arttığı belirlenmiştir. Kolhisin içermeyen ve sadece 2,4-D ile kinetin olan besi yeri ortamında kallus oluşumu daha fazla olmuştur.

Dilsiz (2018), tarafından materyal olarak patates sürgün eksplantlarının kullanıldığı çalışmada, içerlerinde 6 farklı konsantrasyona sahip bitki büyüme düzenleyici bulunduran MS besi yeri ortamında, 3 farklı dozda şeker kullanılmıştır. Tüm bu değişkenler neticesinde patatesde mikro yumru gözlemlenmiştir.

Tripathy vd. (2019), yaptıkları çalışmada asya pirinci bitkisinde genotip farklılıkları, fizyoloji, polen gelişme zamanı, anter kültürü ön muamelesi, besi yeri ortamı, bitki büyüme düzenleyici hormonları gibi anter kültürünü etkileyebilecek değişkenleri araştırmışlardır. Sonuç olarak; MS besi yeri ortamında kallus oranı %11,9 ve rejenerasyon oranı %7,95 olarak belirlenmiştir. Ayrıca N6 besi yeri ortamında ise kallus oluşturma oranı %40,64, rejenerasyon oranı %40,93 ve albino bitki oranı %3,72 olarak belirlenmiştir.

Çakmak vd. (2019), ayçiçeği bitkisinden alınan anterlerle yaptıkları anter kültür çalışmasında, anterler sırasıyla 24 saat/4°C ve 48 saat/35°C’de bekletilerek, farklı konsantrasyonlardaki 6-benzil amino pürin, 2,4-D, indolasetik asit ve NAA içeren besi yeri

ortamlarında kültüre alınmıştır. Sonuç olarak 0,5 mg/l-2,4-D ve 2mg/l NAA genotoksik olarak belirlenmiştir.

Altındal ve Akgün (2019), tarafından anter kültürü çalışmasında, çavdar bitkisinden alınan anterler kullanılmıştır. Çalışmada kallus, anter tepki ve rejenerasyon oranları incelenmiştir. MS besi yeri ortamında soğuk ön muamele uygulanan anterlerin köklenme ve yeşil bitki oranlarının yüksek olduğu belirlenmiştir.

Han vd. (2021), Golden Promise isimli arpa çeşidinden, eksplant olarak olgunlaşmamış emriyolarını kullanarak anter kültürü kaynaklı bir metodoloji geliştirmiştir. Golden Promise ve farklı genotipteki 4 Avustralya çeşidinin denendiği bu çalışmada, HyPDS genini hedeflemek amacıyla kallus oluşumu üzerinde Agrobacterium aracılığıyla transformasyon yöntemini başarmış ve mutasyon T0 albino bitkiler elde edilmiştir. Başarılı mutasyon oranı %53 olarak bildirilmiştir. Diğer anter kültürü yöntemlerine kıyasla verim ve rejenere bitki bakımından daha başarılı olunmuştur. CRISPR çalışmaları için umutvari bir protokol geliştirilmiştir.

İKİNCİ BÖLÜM

2. YÖNTEM

2.1. MATERYAL

Çalışmada; Tarım ve Orman Bakanlığı Ankara Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü, Arpa Islah Birimi'nden tedarik edilen farklı genotiplere sahip iki sıralı 5 farklı tescilli arpa çeşidinden (Tokak 157-37 X Sayım 40 X Aida), (Cirit X Alena) ve (Sayım 40 X Tokak 157-37) üçlü ve ikili melez kombinasyonları kullanılmıştır.

Tablo 1: Melez Popülasyonlarında Baba ve Ana Hat Olarak Kullanılan Arpa Çeşitlerinin Genel Özellikleri

Tokak 157-37	İki sıralı, günlük taban ve yarı taban alanlara ekilen, dane verimi ve maltlık kalitesi iyi, kış ve kurağa karşı hassas, açık sarı renkte, 90- 100 cm boylanabilen, orta erkenci, kuru şartlar altında verimi 250-400 kg/da olan bir arpa çeşididir.	 
Sayım 40	İki sıralı, orta-uzun başağa sahip, kılçıklı, orta boylu, beyaz renkli tohumlara sahip, yarı taban ve kıraç alanlarda ekimi yapılan, yatmaya dayanıklı ve kuru şartlar altında verimi 488-741 kg/da olan yemlik bir arpa çeşididir.	 
Cirit	İki sıralı, kılçıklı, uzun başak yapısına sahip, orta-uzun boylu, beyaz renkli tohuma sahip, yatmaya dayanıklı, orta-geç çıkış zamanı, kuru şartlar altında verimi 404-621 kg/da olan yemlik arpa çeşididir.	 
Aida (Şirket)	Tohum rengi beyaz, kışlık, orta geçci, 85-95 cm boylanabilen, iki sıralı, soğuğa ve yatmaya karşı dayanıklı, 622 kg/da yüksek verime sahip, yemlik ve maltlık arpa çeşididir.	 
Alena (Şirket)	İki sıralı, kışlık, orta boylu ve ortalama 681,2 kg/da verime sahip bir çeşittir. Avusturya'da ıslah edilen bitki 2006 yılında tescillenmiştir.	 
Çalışmada Materyal Olarak Kullanılan Melez Popülasyonları		
1. Melez Popülasyonu:		Tokak 157-37 (X) Aida (X) Sayım 40
2. Melez Popülasyonu:		Sayım 40 (X) Tokak 157-37
3. Melez Popülasyonu:		Cirit (X) Alena

2.2. ARAŞTIRMA YÖNTEMİ

Araştırmada bitkisel materyal olarak daha önceki çalışmalardan kullanılan çeşitlerden elde edilen F1 arpa melezleri (Tokak157-37, Sayım 40, Cirit, Aida, Alena), 2022 yılında Tarla Bitkileri Ankara Yenimahalle melez bahçesinden ekimi yapılan F1 arpa melez kombinasyonlarında morfolojik gözlem yapıp, 3 yapraklı ve bayrak yaprak ile altındaki yaprak arası mesafenin 3-6 cm olan melezlerden örnekler alınmıştır. (Şekil 1). Başağın ikinci boğumunun hemen altından koparılan örnekler içinde su olan bir kaba konulmuştur. Nem kaybını önlemek için içi su dolu kaptaki başakların üzeri bir poşetle kapatılıp laboratuvara getirilmiştir (Şekil 1).

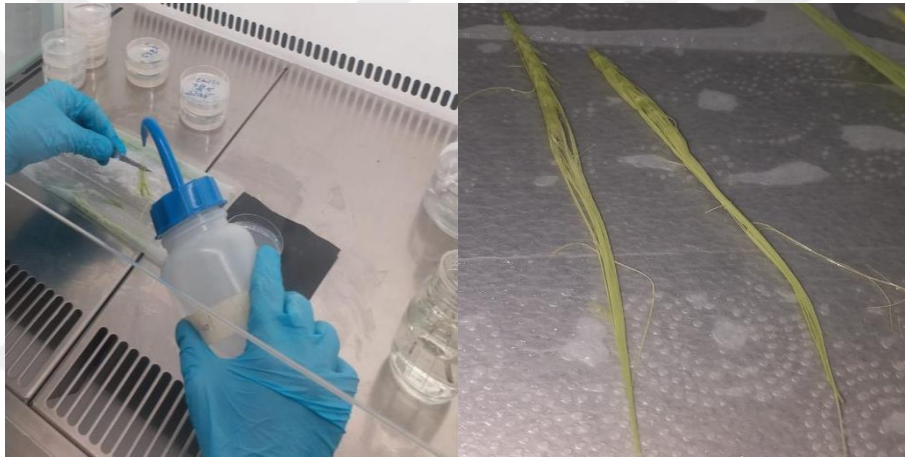


Şekil 1: Melez Bahçesinden Seçilen Uygun Başak Örneklerinin Görünümü

2.2.1. Sterilizasyon

Tüm bitkilerde genel kaide olarak sterilizasyon amacıyla, bu aşamadaki antreleri olan çiçek tomurcukları 15 dakika boyunca bir iki damla Tween-20 damlatılmış %20'lik orandaki ticari amaçla üretilen sodyum hipoklorit (NaClO) veya kalsiyum hipoklorit ile (CaClO_2) yüzeysel sterilizasyon yapılmaktadır ve en az 3 kez steril saf su ile durulanmaktadır (Mukherjee, 2010; Uğur K, Doğan M ve Kaya A. 2019. *Alternanthera reineckii* Briq.'nin doku kültürü çalışmaları için yüzey sterilizasyonunun optimizasyonu, Eurasian J. Bio. Chem. Sci. 2(1): 24-28).

Çalışmamızda materyal olarak kullandığımız farklı kombinasyondaki F1 melez kavuzlu arpaları %70 oranında hazırlanmış alkol ile sterilizasyon yapılarak, 3 kez steril saf su ile durulanmıştır (Klement ve ark., 1990; McDonnell, 2007) (Şekil 2).



Şekil 2: Bitki Yüzey Sterilizasyonu ve Steril Koşullarda Dış Yapraklarından Arındırılmış Arpa Bitkisi Başağı.

Laboratuvar çalışmamızda steril kabinlerimiz bizim çalışma alanımızı oluşturmuştur. Çalışılacak alan önceden %70'lik ethanol alkolle silinerek temizlendi ve odada kimse yokken ve steril kabin kapağı kapalı iken UV ışığı 15 dakika kadar çalıştırıldı. Bununla birlikte cam petri, pens, kurulama kağıtları vb. laboratuvar malzemeleri yüksek sıcaklık ve basınç sağlayan otoklav cihazlarında ($121\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 atmosfer basınç, 15 dakika) steril edildi (Klement ve ark. 1990; McDonnell, 2007). Önceden sterilizasyon hazırlığını yaptığımız steril kabinler içinde, laboratuvara getirilen başakları dezenfeksiyon amacıyla yüzeysel olarak, %70'lik ethanol ile muamele ettirdik. Steril kabinimiz içinde, alkole çok fazla temas ettirip zarar vermeden anter alma aşamasına geçilmiş ve otoklavlanmış veya filtre sterilizasyonu yapılan besi yeri ortamlarına aktarılmıştır. Steril kabinlerle steril bir şekilde tomurcukların içerisinden alınan anterler önceden hazırlanıp otoklavda sterilize edilmiş, kallusa teşvik için stres oluşturma

amacıyla kullanılan ve aslında osmotik şeker olan Mannitol şekerini içeren besin ortamlarına aktarılmıştır (Şekil 3).



Şekil 3: Anterlerin Steril Kabinde Dikkatlice Besi Yerine Aktarılması

Petri kutularındaki agarla katılaştırılmış besi yeri ortamlarına alınan anterlerin aktarımından sonra petri kutularının açık kenarları bir film şeritle veya kâğıt parafinle kapatılarak enfekte olması engellenerek, dış ortam havası ile ilişkisi kesilmiştir. Nihai sonuca ulaşabilmek için 6 mm'lik petri kutusuna 10'ar adet (Bitki türüne ve büyüklüğüne göre 10-15 adet anter aktarılabilir.) anter aktarılmıştır.

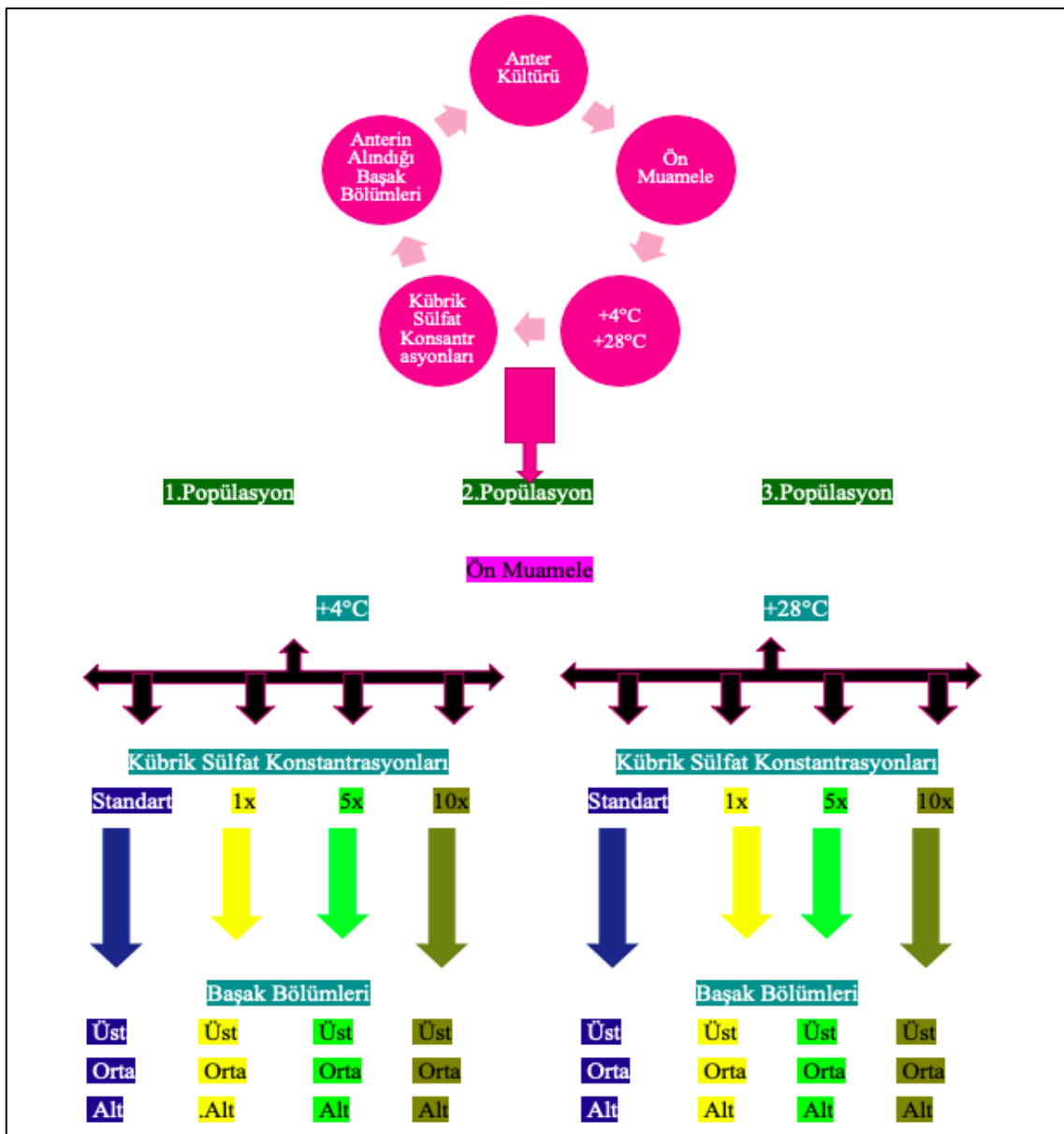
2.2.2. Çalışmanın Temelini Oluşturan Kübrük Sulfat (CuSO_4) Konsantrasyonlarının Kullanıldığı Ön Muamele Uygulaması

Arpa bitkisinde anter kültürü çalışmalarında uygulanan stresin gametofitik gelişmeye engel olduğu ve polen embriyogenesisin tetiklenmesi bakımından önemli ve gerekli olduğu ortaya konulmuştur (Kahrız vd. 2011). Strese yönelik uygulanan işlemler arasında en etkili olanı soğuk ön uygulamaların olduğu araştırmacıların çoğu tarafından bildirilmiştir (Hooghvorst vd. 2018).

Yapılan çalışmada kallus oluşumunu desteklemek ve gelişimine olumlu yönde etki edebilecek birkaç ön muamele yöntemleri kullanılmıştır. Anter kültürüne uygun koşullarda alınmış 10'ar adet anterin mannitol besi yerine alınmasıyla ilk aşama gerçekleştirilmiştir. Mannitol besi yeri; anterin kallus yapmasına teşvik eden ön muamele ortamlarından biridir (Özkan G. 2017). Osmotik şeker olan Mannitol hazır olarak tedarikçisinden satın alınmış ve çalışmamızda kullanılmıştır. Çeşitli konsantrasyondaki Bakır-Kübrük Sülfat (CuSO_4) mannitol ortamına konulmuş, her biri farklı konsantrasyondaki mannitol besi yeri ve iki değişik sıcaklıklarda (4°C ve 28°C olacak şekilde) 4 gün bekletilmiştir. Çalışmaya uygun başaklardan alınan anterlerin kallus oluşturabilme kabiliyetlerinin de incelendiği çalışmada; başaklar aşağıdan başlamak üzere alt kısımdan 4 boğumdaki anterler, orta kısımdan 4 boğumdaki

anterler ve üst kısımdan 4 boğumdaki anterler olacak şekilde steril koşullarda alınarak çeşitli yoğunluktaki kübrik sülfat (Kontrol, 1, 5 ve 10 mg) içeren besi yerlerine alınmıştır. Özet olarak; ön muamelede mannitol besi yerine her bir petri kapında 10 adet anter olacak şekilde toplamda 3 adet (alt, orta ve üst kısımlarından alınan anterler) petri; 4 farklı yoğunluktaki kübrik sülfat (Kontrol, 1, 5 ve 10 mg) dozları; 2 farklı sıcaklık (4 ve 28 °C) uygulamaları ve 3 popülasyon olmak üzere toplamda 72 (72x10) anter ve başlangıç olarak 72 (3x4x2x3) adet petri kabı kullanılmıştır. Bu şekilde, ön stres ve muamele uygulamalarının kallus üzerine etkisi araştırılmıştır (Ön muamele uygulamaları: Eksplant yani başağın alt-üst-orta kısımları, 24-28 derece sıcaklıkları, Kübrik Sülfat-CuSO₄ dozları).

Tablo 2: Yürütülen Laboratuvar Çalışmasına Ait Deneme Düzeni Ana Yapı Şeması



Çalışmanın temelini oluşturan ön muamele uygulamalarının akabinde ise anterler kallus geliştirme ortamına aktarılmıştır. Bu yeni besi yeri içerik bakımından ‘‘Mannitol Besi Yeri’’nden farklıdır. *Kasha vd. (2003)* protokolünde içerikler belirtilmiştir (Tablo 4).

2.2.3. Besi Yeri Ortamının Hazırlanması

Besi yeri ortamına anterler aktarılmadan önce besi yeri ortamının hazırlanması gerekmektedir. Bunun için normal teraziyile tartılamayacak kadar küçük olan mikrostok bileşenleri virgülden sonra dört haneli hassas terazi ile tartımı gerçekleştirilmiştir. Anterlerin besi yeri ortamında büyümesini teşvik eden besin maddesi olarak Mannitol kullanılmıştır (Şekil 4).



Şekil 4: Ön Muamelede Kullanılan Virgülden Sonra 4 Basamaklı Hassas Terazi ve Mannitol.

Hassas terazide tartılamayacak kadar küçük orandaki besin ortamı elementleri (mikrostok bileşikler) 0,01 gram tartılarak 10 ml’lik kapaklı tüplerde çözündürülmüştür. Bu elementler homojenitesi sağlandıktan sonra, kallus geliştirme, rejenerasyon-sürgün ve köklendirme ortamlarında kullanılmak üzere +4 °C’de muhafaza edilmiştir (Tablo 3).

Tablo 3: Mikrostok Bileşik Çözeltisi ve Kullanılan Miktarlar.

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

Anter kültürü çalışmasında kullanmak üzere her bir aşama için hazırlanmış farklı besin elementleri içeren besi yeri ortamları ortamları kullanılmıştır. Bunlar; sırasıyla mannitol, induction (kallus oluşturma) ortamı, kallus geliştirme ve sürgün ortamı, köklendirme ortamlarıdır. İçerik olarak besin elementlerinin miktarları, vitamin ve hormonal olarak farklıdır (Tablo 4). Otoklava dayanıklı olmayan elementler barındırdığı için sterilizasyon için filtre ile sterilizasyon yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde öncelikli olarak kullanılan malzemeler otoklav makinesinde otoklav edildikten sonra, yine otoklavlanmış agar, filtre ile sterilize edilmiş besin ortamına aktarılmıştır. Tüm bu çalışmalar HEPA-filtre ile tozdan ve partikülden arındırılmış hava sağlayan steril kabinlerde gerçekleştirilmiştir (Şekil 5).



Şekil 5: Besi Yeri Ortamı Hazırlanması

2.2.4. Anterlerin, Kallus Gelişiminin Sağlandığı Besi Ortamına Aktarılması

Bu çalışmada, 1 M mannitol standart ve 1mg-5mg-10mg oranlarında kübrik sülfat içeren ön uygulama besi yeri ortamından alınan anterler Kasha vd. (2003), tarafından hazırlanmış protokol olan induction ortamına aktarılmıştır (Tablo 4).

Öncelikle, hazırlanan besi yeri ortamı protokol gereğince pH 5,8 olacak şekilde ayarlanmıştır. Kullanılan besi yeri otoklavlanmış agarın, filtre sterilizasyonu yapılan besi yeri elementlerinin olduğu çözeltiye ilavesi ile gerçekleşmiştir. Otoklav basınç ve derecesine dayanamayan mikro-makro elementler, vitamin ve hormon kullanıldığından, membranlı ve vakumlu sterilizatör ile filtre sterilizasyonu yapılmıştır. +4 ve +28°C de 4 gün bekletilen standart, 1mg, 5mg, 10 mg oranlarında kübrik sülfatlı mannitol ön muamele ortamından gelen ve her bir petride 10'ar adet olan anterler bu aşamada İndaction (kallus gelişim besi yeri) besi yerinin olduğu 60×10 mm'lik petri kutulara aktarılmıştır.

Tablo 4: Kasha Vd. (2003)'de Belirtilen Yönteme Göre Kullanılan Protokol.

Makro elementler	İndüksiyon ortamı (mg/l)	Rejenerasyon ortamı (mg/l)	Köklendirme ortamı (mg/l)
KN03	1900	1900	1900
NH4N03	165	164	164
MgS04.H20	370	-	-
MgS04.7H20	-	370	370
KH2P04	170	170	170
CaCl2.2H20	440	440	440
Demir kaynağı			
FeNa2EDTA	40	-	-
FeSO4.7H2O	-	27,85	20
Na2EDTA	-	37,25	20
Micro tuzlar			
HB03	6,2	7,5	6,2
MnS04.4H20	15,5	40	22,3
ZnSO4.7H20	8,6	10	8,6
KI	0,87	2,5	0,83
Na2Mo04.2H20	0,25	-	0,25
CuS04.5H20	0,025	0,25	0,025
CoCl2.6H20	0,025	0, 25	-
Vitaminler			
Myo-Inositol	100	100	100
Piridoksin HCl	-	-	0,4
Tiamin HCl	0,4	0,4	0,4
Nicotinic asit	-	0,5	0,4
Ascorbic asit	-	1	0,4
Glutamin	730	800	750
Biotin	-	-	0,4
Karbonhidratlar			
Maltoz	61,000	36,000	-
Sukroz	-	-	20,000
NAA	-	-	-
BAP	1	0,8	-
IAA	-	0,5	1
Kinetin	-	0,5	-
Diğer organik bileşikler			
Casein hidrolisat	-	300	-
Phytigel	-	700	-
Agar	-	3,000	6,000
pH	5,6±0.1	5,9±0.1	5,8±0.1

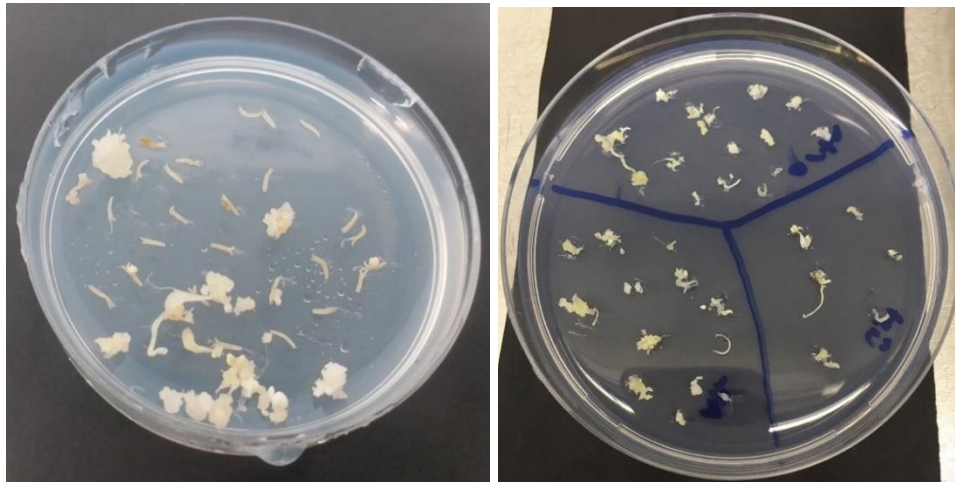


Şekil 6: Anterlerin, Kallus Gelişiminin Sağlandığı Besi Ortamları

Alınan anterler besi yerine başaktan alınma yerlerine göre alt-orta-üst olacak şekilde popülasyonların her birinin numarası yazılarak ve hangi oranda kübrik sülfat içeren besi yeri olduğu belirtilerek, aktarılmıştır. Birçok değişkenin olduğu ön muamele uygulamasının yapıldığı ve daha sonra İndaction ortamına steril koşullarda aktarılan anterler 24°C'ye ayarlanmış inkübatörlerde karanlık ve hiç ışık almayacak şekilde kültüre alınmıştır

2.2.5. Kallusların Gelişimi ve Gelişen Yeşil Kallusların Rejenerasyon Ortamına Aktarılması

Kallus; genel tabiriyle şekilsiz, organize olmamış ve yığılmış hücre topluluklarına denmektedir. Bitkilerin açılan yaralarını tamir etmek için o bölgedeki hücreleri farklılaştırarak yeni bir doku oluşturması durumuna da kallus denmektedir. Bitki doku kültüründe ise bu olay, besi yeri ortamına alınan dokunun, belli işlemlere maruz kaldıktan sonra yeni doku oluşturmak için düzensiz olarak patlaması ve bu hücrelerin steril koşullarda üst üste yığılmasıyla yeni bitkicik oluşmasının sağlanması için basamak oluşturulması olayıdır (Şekil 7).



Şekil 7: Çalışmada Elde Edilen Bazı Arpa Bitkisi Kallusları

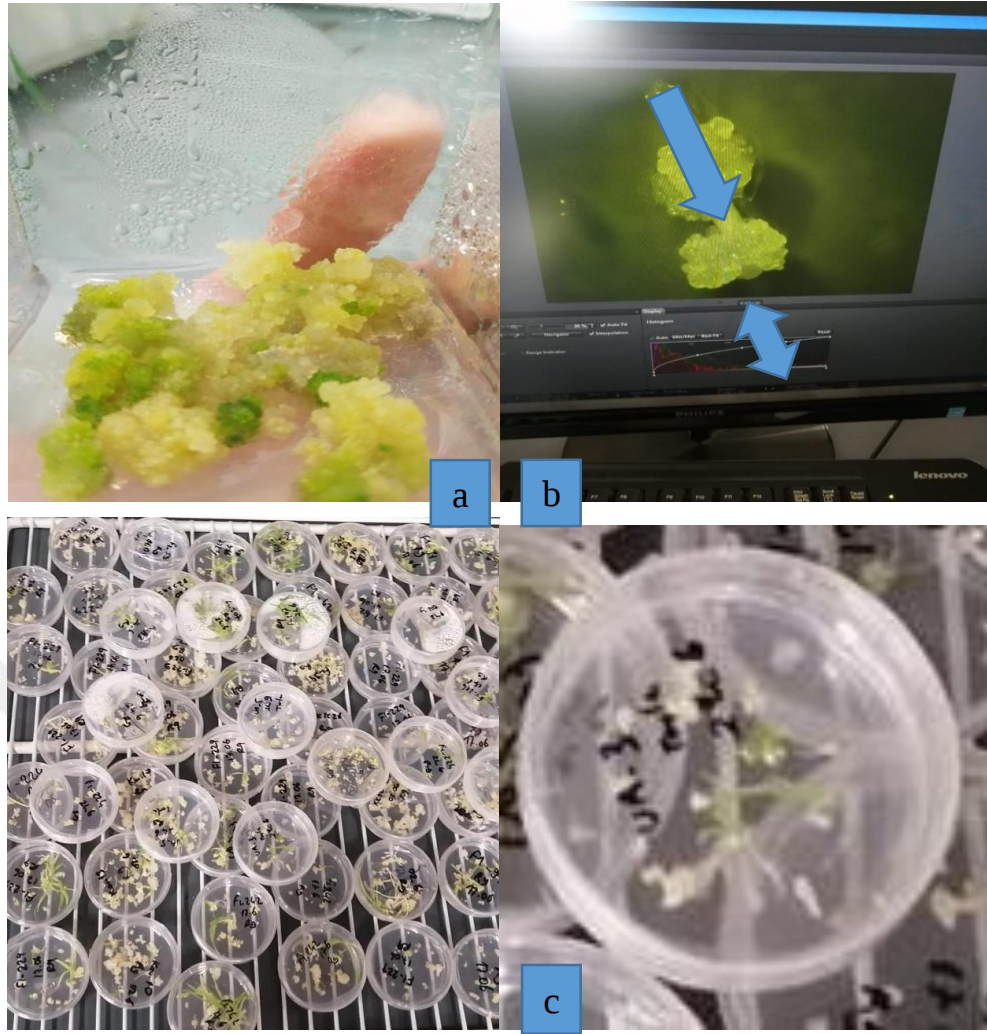
Bitki tür ve çeşitlerine göre kallusun oluşma süresi değişkenlik göstermektedir (Sahijram ve Bahadur 2015). Yapılan çalışmada, arpa bitkisinde genel olarak yaklaşık 3 haftadan sonra anterlerden meydana gelen kalluslar yavaş yavaş gözlenmeye başlamıştır. Bu süre ilerledikçe daha büyük kalluslar oluşmuş ve alt kültüre alınmak üzere gelişim göstermiştir.



Şekil 8: Çalışmada Meydana Gelen Besi Yeri Kontaminasyonu

Gözle görülecek kadar büyüyen kalluslar alt kültüre alınmak amacıyla yine İndaction besi yeri ortamına aktarılmıştır. Alt kültürün amacı sömürülen besi yeri elementleri, hormon vs. maddelerin tekrar kallus oluşumuna katkısı için besi yeri ortamının aynı içerikteki yeni besi yeri ortamıyla değiştirilmesidir. Bu işlemde aktarımlar dikkatli bir şekilde ve yine steril koşullarda yapılmalıdır. Aksi taktirde kontaminasyon riskine davetiye çıkarılmış olmaktadır (Şekil 8). Kontaminasyon oluşumu materyal, ekipman ve en önemlisi zaman israfının oluşmasına neden olmaktadır.

Gelişen kallus dokusu 1cm çapına geldikten sonra alt kültüre değil bu sefer sürgün oluşmasına teşvik için önceden hazırlanan rejenerasyon ortamına (kallus dokunun steril şartlarda ve yapay besin ortamlarında kültüre alınma işlemi) aktarılmıştır. Kallusların gelişimlerine göre hem seyreltmek hem de gelişimini tamamlayıp tamamlamadıklarına göre yine bu rejenerasyon ortamında alt kültüre alınmıştır. Gelişimini tamamlayıp sürgün aşamasına geçen kalluslar dikkatli ve steril koşullarda magentalara aktarılarak, yeterli büyüme alanına imkân sağlanmıştır. Tüm bu işlemlerde kallusların olduğu petri veyahut magentalar 16 saat ışık/8 saat karanlık fotoperiyota ayarlanmış iklim-kültür dolaplarında 25°C derecede gelişim gözlemlenmiştir (Şekil 9).

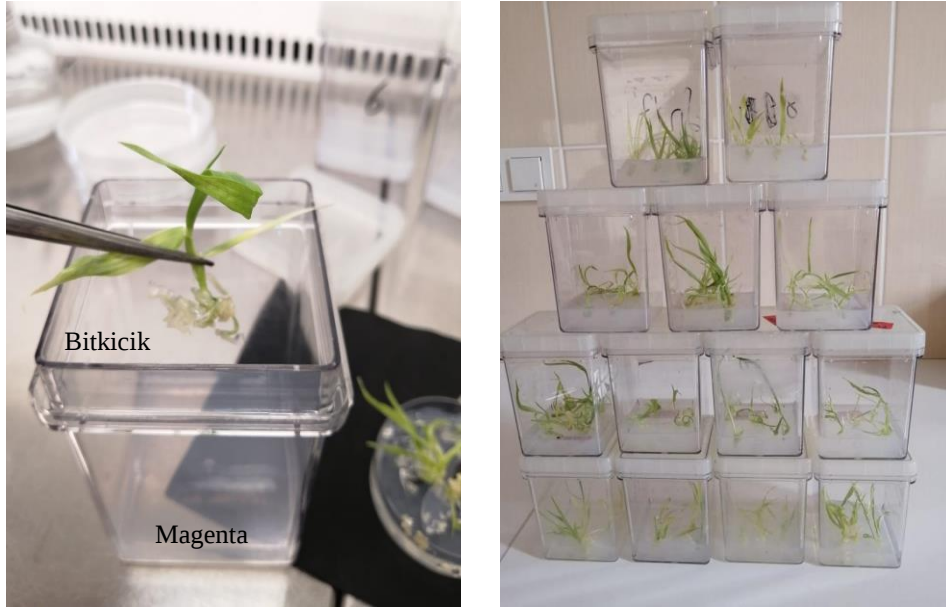


Şekil 9: A. Yeşile Dönmüş Büyük Kalluslar, **B.** Yeşil Kallusların Karanlık Saha Mikroskop Görüntüsü, **C.** Kallustan Sürgüne Dönmüş Bitkiciklerin Besi Yeri İçeren Petrideki Görünüşleri

2.2.6. Kalluslardan Gelişen Bitkiciklerin Köklendirme Ortamına Aktarılması ve Vernalizasyona Tabi Tutulması

Yeşil kalluslardan dönen yeşil bitkiciklerin belli belirsiz köklerinin daha da güçlendirmek için köklendirme besi yerine aktarılmıştır. Bu işlem daha rahat büyüme sağlanması amacıyla magentada hazırlanmış besi yerlerine konarak gerçekleştirilmiştir. Litaratüre göre birçok denemesi yapılmasına rağmen çözüm bulunamamış ve neden olduğu kesin olarak belirlenememiş albino bitkicikler, çalışmanın istatistiği için kaydedilmiş ve daha sonra sayımı yapıp imha edilmiştir.

Tıpkı kallus ortamlarının fotoperiyodu gibi yine 24°C, 16 saat ışık/ 8 saat karanlık olacak şekilde iklim dolaplarına kaldırılan magentaların gelişimleri takip edilmiştir. Kök gelişimi daha az olan sürgünler ortamdaki besin elementlerini sömürdüğü için steril koşullarda diğer sürgünlerden ayrılmıştır. Bu durumdaki köklenmemiş ya da az köklü sürgünler alt kültüre alınarak, köklenme teşvik edilmiştir.



Şekil 10: Viyole Aktarılmaya Hazır, Kökü Gelişmiş Bitkicikler

Elde edilen köklendirilmiş bitkiciklerin bulunduğu petri ve magentalar, arpa bitkisinin vernalizasyon ihtiyacını karşılaması için 30 gün boyunca +4 °C ve 16 saat ışıklanma olacak şekilde iklim dolabına alınarak, bir ay boyunca gözlem-bakım işlemleri yapılmıştır. Bu süre zarfında kontaminasyonun oluşmasını engellemek için magenta kapakları steril kabin içi haricinde açılmadı ve bu sayede kontaminasyon engellenip bitkinin yaşaması sağlandı. Aksi halde köklü bitki bakteri, fungus, virüs vb. patojenlerle enfekte olup yaşamını sürdüremezdi. Bu sayede köklerin besiyeri ortamında kontamine olup, bitkilerin ölmesi engellenmiştir. Kökleri yeterince uzamış olan ve magentada gelişimi zor olabilecek bitkicikler viyollara aktararak, vernalizasyona o şekilde tabi tutulmuştur.

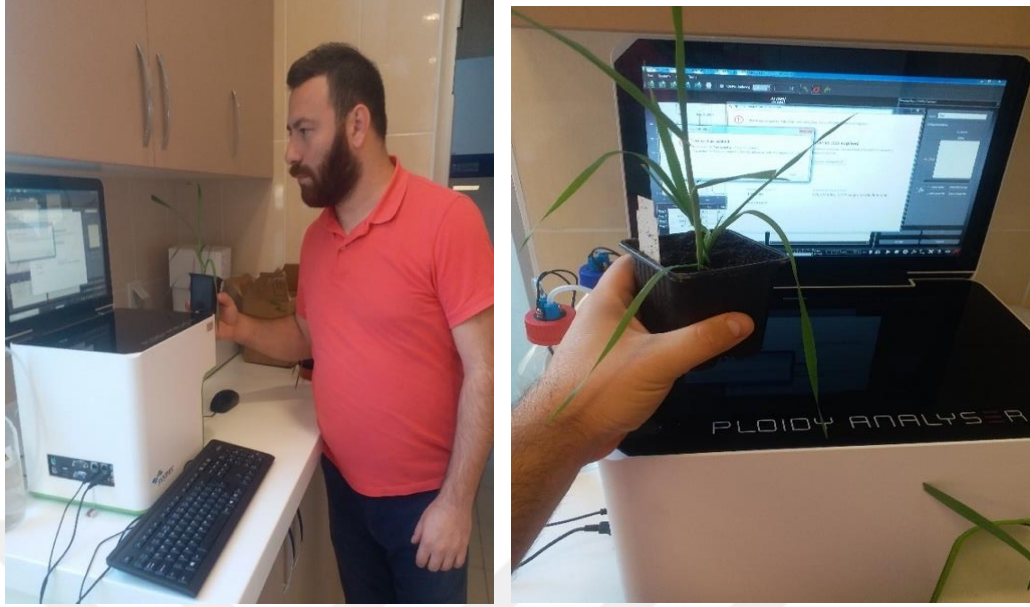
2.2.7. Aklimatizasyon İşlemleri

Vernalizasyon süresini tamamlayan viyol, petri ve magentadaki bitkicikler dış koşullara adaptasyon sağlaması için daha öne hiç kullanılmamış yani atıl olmayıp paketinden yeni açılmış temiz torf ile viyollara aktarılıp, sulaması yapıp, 3 gün boyunca üstlerine delikli poşetler geçirip ve 22 °C de 16 saat gündüz/ 8 saat gece fotoperiyodunda iklim-kültür odasında toprağa alıştırmaya işlemleri yapılmıştır. Bu aşamada perlit vb. ürünler kullanılmadı.

2.2.8. Ploidi Analiz Cihazı İle Elde Edilen Bitkiciklerin Kromozom Katlanmasının Tespiti

İklim odalarında viyollarda gelişimlerini tamamlayıp dört yapraklı hale gelen arpa bitkisinde kromozom katlanmasının olup olmadığını orta koymak için 'SYSMEX' marka ploidy analiz cihazında, cihazın kitleri ile DAPI boyası ile boyama yapılmıştır. Bu yöntem için yeni sürgün yapraklardan 1 cm uzunluğunda parça kesilip, 400 µl solüsyon eklenerek büstri ile

sert darbelerle ezmeden kesilmiştir. Filtreli tüplere otomatik pipet ile çekilip üzerine 800 µl DAPİ boyası eklenmiş ve cihaza uyumlu tüple birlikte ölçüm için cihaza takılmıştır.



Şekil 11: Ploidy Analiz Cihazı'nda Kromozom Katlanma Tespitinin Yapılması

Cihazın ve yöntemin amacı: '2n' kromozoma sahip gerçek bitkilerden alınan 'n' kromozom sayısına sahip erkek üreme organı olan anterin, kullanılan anter kültürü yöntemi uygulamalarıyla ve besi yeri besin maddelerinin sayesinde tekrar '2n' kromozom sayısına sahip, tohum oluşturabilme kabiliyeti olan bitkinin oluşup oluşmamasının tespiti.

2.2.9. Gözlem, Veri ve Ölçümlerin Değerlendirilmesi İle İstatistik Oluşturma

Çalışma aşamalarına göre gerek morfolojik gerekse cihazlara ihtiyaç duyularak yapılan gözlem ve analizlerin belirlenmesiyle istatistik alt yapının oluşturulması, çalışmamızın doğruluğuna ve bundan sonraki çalışmalara ışık tutması bakımından önem arz etmektedir.

2.2.9.1. Başak sayısı (adet)

Çalışmamızın ilk adımlarından biri olan, tarladan toplanan ve arpa anter kültürü yöntemi için kullanılabilecek standart özelliklere sahip başakların sayısı.

2.2.9.2. Anter sayısı (adet)

Toplanan ve uygun şartlarda muhafaza edilen başakların alt-orta-üst kısımlarından alınan, doku kültürü laboratuvarında başlangıç materyali olarak kullanılacak anterlerin sayısı.

2.2.9.3. Kallus sayısı (adet)

Anterlerden elde edilen, besi yeri ortamında çeşitli işlemlerden sonra oluşan, düzensiz hücre yığılmaları diye ifade edilen kallusların sayısı.

2.2.9.4.Sürgün sayısı (adet)

Kallusların, sürgün ortamına aktarıldıktan sonra yeşile dönmesi ve hemen sonrasında alt kültürler ile yeşil kallusların sürgüne dönme sayısı.

2.2.9.5.Albino bitki sayısı (adet)

Anter kültürü çalışmaları sonucunda oluşabilen, istenmeyen,neden olduğu henüz bilinmeyen, beyaz renkli ve gelişebilme özelliği olmayıp dış koşullarda hemen ölen albino bitki sayısı.

2.2.9.6.Rejenerasyona uğrayan köklü yeşil bitki sayısı (adet)

Çalışmamızın nihayetinde elde edilen, yeşil renkli, rejenere olmuş bitki sayısı.

2.2.9.7.Ploidi analiz cihazı ölçümleri

Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Biyoteknoloji Birimi Doku Kültür Laboratuvarı'nda kullanılan, kromozom katlanmalarının kit ile ölçüldüğü Symex marka Ploidi Analiz Cihazı sonuçlarına göre, tohum bağlayabilme özelliğine sahip double haploit (DH) bitki elde edilip edilmediği sayısı.

2.2.9.8.İstatistiksel değerlendirme

Çalışmada elde edilen verilerin istatistik analiz ve değerlendirmeleri ‘‘JMP v.11 İstatistik Analiz Programı’’ ile yapılmıştır. İstatistik veriler ile varyans analizi, katsayı ortalaması ve F değeri belirlenerek; önemlilikler, ortalamalar ve interaksiyon tespit edilmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçların istatistiksel verileri, tesadüf blokları deneme parseline göre belirlenmiştir.

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

3. BULGULAR

Çalışmamızda, materyel olarak kullandığımız arpa bitkisi melez popülasyonlarından alınan anterlerle yaptığımız, “Haploid Bitki Elde Etme” yöntemlerinden biri olan “Anter Kültürü” metodu kullanılmıştır. +4°C (Szarejko ve Kasha (1991) ve +28°C (Hassawi ve Liang, 1990) olmak üzere 2 farklı sıcaklık, anterleri aldığımız başakların eksplantı (başakların alt, orta ve üst kısımları) (Szarejko ve Kasha, 1991) ve birbirinden farklı Küprik-BakırII Sülfat (CuSO₄) dozları (0 yani kontrol grubu, 1, 5, 10) (Jacquard vd. 2006; Sriskandarajah vd.2015) kullanılarak ve 3 melez popülasyonlarıyla yaptığımız çalışmamızda, farklı ön muamele uygulamalarının haploid bitki oluşumunda melez popülasyonlar üzerindeki etkilerine ait analizler yapılmıştır. Kallus, sürgün ve rejenere bitki (yeşil bitki) çıktılarının istatistikleri ayrı ayrı incelenmiş ve istatistiksel analizi yapılmıştır.

Çalışmamızda elde ettiğimiz verilerin istatistik analiz ve değerlendirmeleri “JMP v.11 İstatistik Analiz Programı” ile yapılmıştır. İstatistik veriler ile varyans analizi, katsayı ortalaması ve F değeri belirlenerek; önemlilikler, ortalamalar ve interaksiyon tespit edilmiştir. Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçların istatistiksel verileri, tesadüf deneme desenine göre belirlenmiştir.

3.1. KALLUS VERİ İSTATİSTİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

3.1.1. 1.Melez Popülasyonunda Farklı Sıcaklık Ön Muameleleri, Eksplant ve CuSO₄ (Küprik Sülfat) Dozlarının Uygulanmasıyla Elde Edilen Kallusların İstatistik Verileri

Tablo 5: 1.Melez Popülasyonu Kallus ‘Varyans Analizi’

Kallus Sayısı (adet)			
Varyasyon Kaynağı	SD	KO	F değeri
Tekerrür	2	0.167	0.793
Sıcaklık Muamelesi	1	8.000	38.069**
Ön muamele (CuSO ₄ Doz)	3	17.889	85.126**
Sıcaklık Muamelesi x Ön muamele	3	0.926	4.406**
Eksplant	2	1.125	5.353**
Sıcaklık Muamelesi x Eksplant	2	0.042	0.198
Ön muamele x Eksplant	6	2.014	9.583**
Sıcaklık Muamelesi x Ön Muamele x Eksplant	6	0.190	0.903**
Hata	46	0.210	
Genel Toplam	71		
* 0.05. **0.01 düzeyinde önemlidir. ö.d.: önemli değil			

Çizelge incelendiğinde 1. popülasyonda kallus sayısı bakımından sıcaklık muamelesi, ön muamele, eksplant uygulamaları arasında istatistiki olarak %1 önem seviyesinde farklılıklar tespit edilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre sıcaklık muamelesi x ön muamele, ön muamele x eksplant ve sıcaklık muamelesi x ön muamele x eksplant uygulamaları arasında interaksiyon tespit edilmiştir.

Tablo 6: 1.Melez Popülasyonu: Kübrik Sülfat, Sıcaklık Ön Muameleleri ve Eksplant Değişkenlerinin, Kallus Oluşturma İstatistiki Verileri Tablosu.

CuSO ₄ (mg/l)	Ortam Sıcaklığı								Genel Ort.
	+4 °C				+28 °C				
	Başak Eksplantı (adet)								
	Alt	Orta	Üst	Ort.	Alt	Orta	Üst	Ort.	
0	6,67a	5,67bc	6,33ab	6,22	5,33cd	5,00cd	5,33cd	5,22	5,72a
1	3,33fg	3,33fg	4,00ef	3,55	3,67fg	3,33fg	3,67fg	3,56	3,56c
5	5,00cd	4,67de	6,33ab	5,33	4,00ef	4,00ef	5,33cd	4,44	4,89b
10	4,00ef	5,00cd	3,67fg	4,22	3,00g	4,00ef	3,33fg	3,44	3,83c
EKS-Ort	4,75b	4,67b	5,08a	-----	4,00b	4,08b	4,42a	-----	4.50
Sıcak Ort.	4,83a				4,16b				

Çizelge incelendiğinde; çalışmada kübrik ön muameleleri bakımından kallus sayısı ortalamaları 3.56-5.72 adet ortam sıcaklığı uygulamaları arasında 4.16-4.83 adet, eksplantlar arasında ise 4.00-5.08 adet arasında değişmiştir.

1. popülasyonda en yüksek kallus sayısı (6.67 adet) +4°C’de, kontrol kübrik dozda ve başakların alt kısmından alınan anterlerden elde edilmiştir. En düşük kallus sayısının ise 3.00 adet ile 28 °C’de, 10 mg/l’lik kübrik uygulamasında ve başaklarının alt kısmından alınan anterlerde olduğu gözlenmiştir.

Kübrik dozlarına göre ise en yüksek kallus sayısı 5.72 adet ile kontrol grubunda, en az kallus sayısı ise istatistiki olarak aralarında fark bulunmayan 1 ve 10 kübrik uygulanan ortamlardan elde edilmiştir (sırasıyla 3.56-3.83 adet).

Ortam sıcaklarına göre ise en yüksek kallus sayısı 4.83 adet ile +4°C’den elde edilmişken, +28 °C’de ise 4.16 adet kallus sayısına ulaşılmıştır. Ortam sıcaklarına göre her iki ortam sıcaklığında da başakların üst kısımlarından alınan anterlerden en yüksek kallus sayılarına ulaşılmıştır. (4°C 5.08- 28°C 4.42 adet kallus).

3.1.2. 2.Melez Popülasyonunda Farklı Sıcaklık Ön Muameleleri, Eksplant ve CuSO₄ (Küprik Sülfat) Dozlarının Uygulanmasıyla Elde Edilen Kallusların İstatistik Verileri

Tablo 7: 2.Melez Popülasyonu Kallus ‘Varyans Analizi’

Varyasyon Kaynağı	Kallus sayısı (adet)		
	SD	KO	F değeri
Tekerrür	2	0.222	1.000
Sıcaklık Muamelesi	1	20.056	90.250**
Ön muamele (CuSO ₄ Doz)	3	28.037	126.167**
Sıcaklık Muamelesi x Ön muamele	3	0.463	2.083
Eksplant	2	1.097	4.938*
Sıcaklık Muamelesi x Eksplant	2	0.014	0.062
Ön muamele x Eksplant	6	0.301	1.354
Sıcaklık Muamelesi x Ön Muamele x Eksplant	6	0.144	0.646
Hata	46	0.222	
Genel Toplam	71		

* 0.05. **0.01 düzeyinde önemlidir. ö.d.: önemli değil

Çizelge incelendiğinde 2. popülasyonda kallus sayısı bakımından sıcaklık muamelesi ve ön muamele uygulamaları arasında istatistiki olarak %1 önem seviyesinde, eksplanlar arasında ise %5 önem seviyesinde farklılıklar tespit edilmiştir.

Tablo 8: 2.Melez Popülasyonu: Küprik Sülfat, Sıcaklık Ön Muameleleri ve Eksplant Değişkenlerinin, Kallus Oluşturma İstatistiki Verileri Tablosu.

CuSO ₄ (mg/l)	Ortam Sıcaklığı								Genel Ort.
	+4 °C				+28 °C				
	Başak Eksplantı (adet)								
	Alt	Orta	Üst	Ort.	Alt	Orta	Üst	Ort.	
0	5,66	5,33	5,33	5,44	4,00	4,00	4,00	4,00	4,72a
1	2,33	3,00	2,33	2,55	1,33	1,66	1,33	1,44	2,00c
5	2,66	2,66	2,33	2,55	2,00	2,33	1,33	189	2,22c
10	2,66	3,66	3,00	3,11	2,00	2,33	2,00	2,11	2,61b
EKS-Ort	3,33b	3,66a	3,25b	-----	2,33ab	2,58a	2,17b	-----	2.89
Sıcak Ort.	3,41a				2,36b				

2. popülasyonda kallus sayıları sıcaklık muamelelerinde 2.36-3.41 adet, eksplantlar arasında 2.17-3.66 adet, küprik uygulamalarında 2.00-4.72 adet arasında bulunmuştur.

2. popülasyonda sıcaklık muamelelerine göre en yüksek kallus sayısı (3.41 adet) 4°C’de elde edilmiştir. Eksplantlara göre ise 4°C ve 24°C’de en yüksek kallus sayısı başakların ortalarından alınan anterlerden (sırasıyla 3.66 adet, 2.58 adet) elde edilmiştir. Küprik uygulamaları arasında ise en yüksek kallus sayısı ise 4.72 adet ile küprik uygulanmayan anterlerde tespit edilmiştir.

3.1.3. 3.Melez Popülasyonunda Farklı Sıcaklık Ön Muameleleri, Eksplant ve CuSO₄ (Küprik Sülfat) Dozlarının Uygulanmasıyla Elde Edilen Kallusların İstatistik Verileri

Tablo 9: 3.Melez Popülasyonu Kallus ‘Varyans Analizi’

Varyasyon Kaynağı	Kallus sayısı (adet)		
	SD	KO	F değeri
Tekerrür	2	0.056	0.561
Sıcaklık Muamelesi	1	10.125	102.238**
Ön muamele (CuSO ₄ Doz)	3	17.458	176.287**
Sıcaklık Muamelesi x Ön muamele	3	0.162	1.636
Eksplant	2	0.097	0.982
Sıcaklık Muamelesi x Eksplant	2	0.042	0.421
Ön muamele x Eksplant	6	1.097	11.079**
Sıcaklık Muamelesi x Ön Muamele x Eksplant	6	0.523	5.283**
Hata	46	0.099	
Genel Toplam	71		

* 0.05. **0.01 düzeyinde önemlidir. ö.d.: önemli değil

Çizelge incelendiğinde 1. popülasyonda kallus sayısı bakımından sıcaklık muameleleri ve ön muameleler arasında istatistiki olarak %1 önem seviyesinde farklılıklar tespit edilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre ön muamele x eksplant ve sıcaklık muamelesi x ön muamele x eksplant uygulamaları arasında % 1 önem seviyesinde interaksiyon tespit edilmiştir.

Tablo 10: 3.Melez Popülasyonu: Küprik Sülfat, Sıcaklık Ön Muameleleri ve Eksplant Değişkenlerinin, Kallus Oluşturma İstatistiki Verileri Tablosu.

CuSO ₄ (mg/l)	Ortam Sıcaklığı								Genel Ort.
	+4 °C				+28 °C				
	Başak Eksplantı (adet)								
	Alt	Orta	Üst	Ort.	Alt	Orta	Üst	Ort.	
0	5,00a	5,00a	5,00a	5,00	4,00bc	4,33b	4,33b	4,00	4,61a
1	4,00bc	3,00d	3,00d	3,33	3,00d	2,00fg	2,00fg	2,33	2,83c
5	2,00fg	3,00d	3,00d	2,67	2,33ef	2,00fg	1,66g	2,00	2,33d
10	3,66c	3,66c	4,00bc	3,33	2,66de	3,00d	4,00bc	3,22	3,50b
EKS-Ort	3,67	3,67	3,75	-----	3,00	2,83	3,00	-----	3,32
Sıcak Ort.				3,69a				2,94b	

Çizelge incelendiğinde; çalışmada küprik ön muameleleri bakımından kallus sayısı ortalamaları 2.33-4.61 adet, ortam sıcaklığı uygulamaları arasında 2.94-3.69 adet, eksplantlar arasında ise 2.83-3.75 adet arasında değişmiştir.

1. popülasyonda en yüksek kallus sayısı (5 adet) 4°C’de, kontrol grubu küprik dozda ve başakların alt, orta ve üst kısımlarından alınan anterlerden elde edilmiştir. En düşük kallus sayısı ise 3.00 adet ile 28 °C’de, 10 küprik uygulamasında ve başaklarının alt kısmından alınan anterlerde elde edilmiştir.

Küprik dozlarına göre ise en yüksek kallus sayısı 4.61 adet ile 0 (kontrol) küprik uygulanan ortamdan, en az ise (2.33 adet) 5 küprik uygulanan ortamdan elde edilmiştir.

Ortam sıcaklıklarına göre ise en yüksek kallus sayısı 3.69 adet ile 4°C'den elde edilmişken, 28 °C'de ise 2.94 adet kallus sayısına ulaşılmıştır.

3.2. SÜRGÜN VERİLERİNİN İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRİLMESİ

3.2.1. 1.Melez Popülasyonu, Ebriyonik Kalluslardan Sürgün Oluşma İstatistik Verileri

Tablo 11: 1.Melez Popülasyonu Sürgün 'Varyans Analizi'

Sürgün sayısı (adet)			
Varyasyon Kaynağı	SD	KO	F değeri
Tekerrür	2	0.389	0.691
Sıcaklık Muamelesi	1	2.347	4.171 *
Ön muamele (CuSO ₄ Doz)	3	10.495	18.648 **
Sıcaklık Muamelesi x Ön muamele	3	0.162	0.288
Eksplant	2	0.681	1.209
Sıcaklık Muamelesi x Eksplant	2	0.181	0.321
Ön muamele x Eksplant	6	1.106	1.966
Sıcaklık Muamelesi x Ön Muamele x Eksplant	6	0.495	0.880
Hata	46	0.563	
Genel Toplam	71		

* 0.05. **0.01 düzeyinde önemlidir. ö.d.: önemli değil

Çizelge incelendiğinde 1. popülasyonda sürgün sayısı bakımından sıcaklık muameleleri arasında % 5, ön muameleler arasında istatistiki olarak %1 önem seviyesinde farklılıklar tespit edilmiştir.

Tablo 12: 1.Melez Popülasyonundan Elde Edilen Sürgünlerin İstatistik Verileri Tablosu.

CuSO ₄ (mg/l)	Ortam Sıcaklığı								Genel Ort.
	+4 °C				+28 °C				
	Başak Eksplantı (adet)								
	Alt	Orta	Üst	Ort.	Alt	Orta	Üst	Ort.	
0	3,66	3,66	3,66	3,66	3,00	3,33	2,33	2,87	3,27a
1	1,33	1,33	2,33	1,66	2,00	0,66	2,00	1,55	1,61c
5	3,00	2,00	2,66	2,55	2,33	1,66	2,66	2,22	2,39b
10	2,33	2,66	1,66	2,22	1,33	2,00	2,00	1,78	2,00bc
EKS-Ort	2,58	2,41	2,58	-----	2,17	1,91	2,25	-----	2,32
Sıcak Ort.	2,52a				2,11b				

Çizelge incelendiğinde; çalışmada küprik ön muameleleri bakımından sürgün sayısı ortalamaları 1.61-3.27 adet, ortam sıcaklığı uygulamaları arasında 2.11-2.52 adet, eksplantlar arasında ise 1.91-2.58 adet arasında değişmiştir.

1. popülasyonda sıcaklık ön muameleleri uygulamalarında en yüksek sürgün sayısı (2.52 adet) 4°C’de, en az ise 24°C’de elde edilmiştir(2.11 adet). Küprik uygulamaları arasında ise fazla sürgün sayısı 3.27 adet ile kontrol grubunda, an az sürgün sayısı ise 1.61 adet ile 1 küprik uygulamalarından elde edilmiştir.

3.2.2. 2.Melez Popülasyonu, Ebriyonik Kalluslardan Sürgün Oluşma İstatistik Verileri

Tablo 13: 2.Melez Popülasyonu Sürgün ‘Varyans Analizi’

Sürgün sayısı (adet)			
Varyasyon Kaynağı	SD	KO	F değeri
Tekerrür	2	0.097	0.272
Sıcaklık Muamelesi	1	2.722	7.602 **
Ön muamele (CuSO ₄ Doz)	3	8.259	23.065 **
Sıcaklık Muamelesi x Ön muamele	3	0.315	0.879
Eksplant	2	1.764	4.926 *
Sıcaklık Muamelesi x Eksplant	2	0.431	1.202
Ön muamele x Eksplant	6	0.412	1.151
Sıcaklık Muamelesi x Ön Muamele x Eksplant	6	0.301	0.840
Hata	46	0.358	
Genel Toplam	71		
* 0.05. **0.01 düzeyinde önemlidir. ö.d.: önemli değil			

Çizelge incelendiğinde 2. popülasyonda sürgün sayısı bakımından sıcaklık muamelesi ve ön muamele uygulamaları arasında istatistiki olarak %1 önem seviyesinde, eksplantlar arasında ise %5 önem seviyesinde farklılıklar tespit edilmiştir.

Tablo 14: 2.Melez Popülasyonundan Elde Edilen Sürgünlerin İstatistik Verileri Tablosu.

CuSO ₄ (mg/l)	Ortam Sıcaklığı								Genel Ort.
	+4 °C				+28 °C				
	Başak Eksplantı (adet)								
	Alt	Orta	Üst	Ort.	Alt	Orta	Üst	Ort.	
0	2,33	3,00	2,66	2,66	2,00	2,66	1,66	2,11	2,39a
1	0,66	1,33	0,66	0,88	1,00	0,66	0,66	0,77	0,83c
5	1,66	1,33	0,66	1,22	1,33	1,33	0,33	1,00	1,11bc
10	1,33	2,33	1,66	1,77	1,33	1,00	1,00	1,00	1,44b
EKS-Ort	1,50b	2,00a	1,41b	-----	1,42a	1,41a	0,91b	-----	1,44
Sıcak Ort.				1,63a				1,25b	

2. popülasyonda sürgün sayıları sıcaklık muamelelerinde 1.25-1.63 adet, eksplantlar arasında 0.91-2.00 adet, küprik uygulamalarında 0.83-2.39 adet arasında bulunmuştur.

2. popülasyonda sıcaklık muamelelerine göre en yüksek sürgün sayısı (1.63 adet) 4°C’de elde edilmiştir. Eksplantlara göre ise 4°C’de en yüksek sürgün sayısı, başakların ortalarından alınan anterlerden (2.00 adet) elde edilmiş ve 24°C’de en yüksek sürgün sayısı başakların altlarından alınan anterlerden (1.42 adet) elde edilmiş. Küprik uygulamaları arasında ise en

yüksek sürgün sayısı ise 2.39 adet ile küprik uygulanmayan kontrol grubu anterlerde tespit edilmiştir.

3.2.3. 3.Melez Popülasyonu, Ebriyonik Kalluslardan Sürgün Oluşma İstatistik Verileri

Tablo 15: 3.Melez Popülasyonu Sürgün ‘Varyans Analizi’

Sürgün sayısı (adet)			
Varyasyon Kaynağı	SD	KO	F değeri
Tekerrür	2	0.097	0.309
Sıcaklık Muamelesi	1	3.125	9.933 **
Ön muamele (CuSO ₄ Doz)	3	12.977	41.247 **
Sıcaklık Muamelesi x Ön muamele	3	0.051	0.162
Eksplant	2	0.597	1.898
Sıcaklık Muamelesi x Eksplant	2	2.042	6.489 **
Ön muamele x Eksplant	6	0.838	2.663 *
Sıcaklık Muamelesi x Ön Muamele x Eksplant	6	0.245	0.780
Hata	46	0.315	
Genel Toplam	71		

* 0.05. **0.01 düzeyinde önemlidir. ö.d.: önemli değil

Çizelge incelendiğinde 3. popülasyonda sürgün sayısı bakımından sıcaklık muamelesi, ön muamele ve sıcaklık muamelesi x explant uygulamaları arasında istatistiki olarak %1 önem seviyesinde, ön muamele x eksplantlar arasında ise %5 önem seviyesinde farklılıklar tespit edilmiştir.

Tablo 16: 3.Melez Popülasyonundan Elde Edilen Sürgünlerin İstatistik Verileri Tablosu.

CuSO ₄ (mg/l)	Ortam Sıcaklığı								Genel Ort.
	+4°C				+28 °C				
	Başak Eksplantı (adet)								
	Alt	Orta	Üst	Ort.	Alt	Orta	Üst	Ort.	
0	3,00	3,66	3,33	3,33	3,00	2,66	3,00	2,89	3,11a
1	2,33	1,33	1,66	1,77	2,00	0,66	1,00	1,22	1,50c
5	1,00	1,66	1,33	1,33	1,33	0,33	1,33	1,00	1,16c
10	1,33	2,33	2,66	2,11	2,00	1,33	2,00	1,78	1,94b
EKS-Ort	1,92a	2,25a	2,25a	-----	2,08a	1,20b	1,83a	-----	1,93
Sıcak Ort.				2,14a				1,72b	

Çizelge incelendiğinde; çalışmada küprik ön muameleleri bakımından sürgün sayısı ortalamaları 1.16-3.11 adet, ortam sıcaklığı uygulamaları arasında 1.72-2.14 adet, eksplantlar arasında ise 1.20-2.25 adet arasında değişmiştir.

3. popülasyonda en yüksek sürgün sayısı (3.66 adet) 4°C’de. 0 grubu kontrol küprik dozda ve başakların orta kısmından alınan anterlerden elde edilmiştir. En düşük kallus sayısı ise 0.33 adet ile 28 °C’de, 5 doz küprik uygulamasında ve başaklarının orta kısmından alınan anterlerde elde edilmiştir.

Küprik dozlarına göre ise en yüksek sürgün sayısı 3.11 adet ile kontrol grubundan, en az ise istatistiki olarak aralarında fark bulunmayan 1 ve 5 küprik uygulanan ortamlardan elde edilmiştir (sırasıyla 1.16-1.50 adet).

Ortam sıcaklıklarına göre ise en yüksek kallus sayısı 2.14 adet ile 4°C’den elde edilmişken, en düşük ise 28 °C’de ve 1.72 adet kallus sayısına ulaşılmıştır.

Eksplant bakımından en yüksek sürgün sayısı aralarında istatistik bir fark bulunmayan 4 °C’de 2.25-orta, 2.25-üst, 1.92-alt ve 28°C’de 2.08-alt, 1.83-üst olacak şekilde en yüksek oran bulunmuşken; en düşük sayıdaki sürgün sayısı 1.20 adet ile 28 °C’de orta kısımdan alınan anterlerden elde edilmiştir.

3.3. REJENERE OLMUŞ (BİTKİCİK) BİTKİNİN İSTATİSTİKSEL OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

3.3.1. 1.Melez Popülasyonu Rejenerasyon İstatistik Verileri

Tablo 17: 1.Melez Popülasyonu Rejenere Bitki ‘Varyans Analizi’

Rejenere bitki sayısı (adet)			
Varyasyon Kaynağı	SD	KO	F değeri
Tekerrür	2	0.264	0.623
Sıcaklık Muamelesi	1	0.125	0.295
Ön muamele (CuSO ₄ Doz)	3	3.014	7.120 **
Sıcaklık Muamelesi x Ön muamele	3	0.532	1.258
Eksplant	2	1.347	3.183
Sıcaklık Muamelesi x Eksplant	2	0.042	0.098
Ön muamele x Eksplant	6	0.958	2.264
Sıcaklık Muamelesi x Ön Muamele x Eksplant	6	1.949	4.604 **
Hata	46	0.423	
Genel Toplam	71		

* 0.05. **0.01 düzeyinde önemlidir. ö.d.: önemli değil

Çizelge incelendiğinde 1. popülasyonda rejenere bitki sayısı bakımından küprik doz ön muamele uygulamaları arasında istatistiki olarak %1 önem seviyesinde farklılıklar tespit edilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre sıcaklık muamelesi x ön muamele x eksplant uygulamaları arasında interaksiyon tespit edilmiştir.

Tablo 18: 1.Melez Popülasyonundan Elde Edilen Rejenere Bitkilerin İstatistiksel Verileri Tablosu.

CuSO ₄ (mg/l)	Ortam Sıcaklığı								Genel Ort.
	+4°C				+28 °C				
	Başak Eksplantı (adet)								
	Alt	Orta	Üst	Ort.	Alt	Orta	Üst	Ort.	
0	2,66a	1,33be	1,66ad	1,88	1,33be	2,66a	1,33be	1,77	1,83a

1	0,33e	1,33be	1,00ce	0,89	2,00ac	0,33e	1,00ce	1,11	1,00b
5	0,66de	1,00ce	1,00ce	0,89	0,66de	1,33be	1,00ce	1,00	0,94b
10	1,33be	2,33ab	0,66de	1,44	0,33e	1,66ad	0,66de	0,88	1,16b
EKS-Ort	1,25	1,50	1,08	-----	1,08	1,50	1,00	-----	1,23
Sıcak Ort.				1,27				1,19	

Çizelge incelendiğinde; çalışmada küprik ön muameleleri bakımından rejenere bitki sayısı ortalamaları 0.94-1.83 adet arasında değişmiştir.

1. popülasyonda en yüksek rejenere bitki sayısı (2.66 adet) 4°C’de kontrol grubu küprik dozunda ve başakların alt kısmından alınan anterlerden elde edilmiştir. En düşük kallus sayısı ise 0.33 adet ile 28 °C’de 10 doz uygulanan alt kısım ve 4°C’de başakların alt kısımlarından alınan, 1 küprik uygulanan, anterlerden elde edilmiştir.

Küprik dozlarına göre ise en yüksek rejenere bitki sayısı 1.83 adet ile 0 küprik uygulanan ortamdaki, en az ise istatistiki olarak aralarında fark bulunmayan 1,5 ve 10 küprik uygulanan ortamlardan elde edilmiştir (sırasıyla 1.00, 0.94 ve 1.16 adet).

3.3.2. 2.Melez Popülasyonu Rejenerasyon İstatistik Verileri

Tablo 19: 2.Melez Popülasyonu Rejenere Bitki ‘Varyans Analizi’

Rejenere bitki sayısı (adet)			
Varyasyon Kaynağı	SD	KO	F değeri
Tekerrür	2	0.014	0.037
Sıcaklık Muamelesi	1	1.125	2.990
Ön muamele (CuSO ₄ Doz)	3	2.681	7.125 **
Sıcaklık Muamelesi x Ön muamele	3	0.310	0.825
Eksplant	2	7.722	20.526 **
Sıcaklık Muamelesi x Eksplant	2	0.500	1.329
Ön muamele x Eksplant	6	0.556	1.477
Sıcaklık Muamelesi x Ön Muamele x Eksplant	6	0.296	0.788
Hata	46	0.376	
Genel Toplam	71		
* 0.05. **0.01 düzeyinde önemlidir. ö.d.: önemli değil			

Çizelge incelendiğinde 2. popülasyonda sürgün sayısı bakımından Sıcaklık Muameleleri ve eksplant arasında istatistiki olarak %1 önem seviyesinde farklılıklar tespit edilmiştir.

Tablo 20: 2.Melez Popülasyonundan Elde Edilen Rejenere Bitkilerin İstatistiksel Verileri Tablosu.

CuSO ₄ (mg/l)	Ortam Sıcaklığı								Genel Ort.
	+4 °C				+28 °C				
	Başak Eksplantı (adet)								
	Alt	Orta	Üst	Ort.	Alt	Orta	Üst	Ort.	
0	1,33	3,00	1,00	1,78	1,00	2,33	0,66	1,33	1,55a

1	0,33	1,33	0,33	0,66	1,00	0,66	0,66	0,77	0,72b
5	1,00	1,33	0,33	0,89	0,33	1,33	0,33	0,66	0,78b
10	0,66	2,00	0,66	1,11	0,66	1,00	0,33	0,66	0,89b
EKS-Ort	0,83b	1,92a	0,58b	-----	0,75b	1,33a	0,50b	-----	0,98
Sıcak Ort.	0,83				0,86				

Çizelge incelendiğinde; çalışmada küprik ön muameleleri bakımından rejenere bitki sayısı ortalamaları 0.72-1.55 adet, eksplantlar arasında ise 0.50-1.92 adet arasında değişmiştir.

2. popülasyonda küprik ön muamele uygulamalarında en yüksek rejenere bitki sayısı (1.55 adet) kontrol grubundan, en düşük ise 1 doz küprik uygulanan gruptan elde edilmiştir (0.72 adet). Eksplantlar arasında ise en fazla rejenere olmuş bitki sayısı (1.92 adet) 4°C’de orta kısımdan alınan, en düşük sayı olarak ise (0.50 adet) 28°C’de uç kısımlardan alınan anterlerden elde edilmiştir.

3.3.3. 3.Melez Popülasyonu Rejenerasyon İstatistik Verileri

Tablo 21: 3.Melez Popülasyonu Rejenere Bitki ‘Varyans Analizi’

Kallus sayısı (adet)			
Varyasyon Kaynağı	SD	KO	F değeri
Tekerrür	2	0.056	0.215
Sıcaklık Muamelesi	1	1.125	4.353 *
Ön muamele (CuSO ₄ Doz)	3	5.199	20.116 **
Sıcaklık Muamelesi x Ön muamele	3	0.051	0.197
Eksplant	2	4.056	15.692 **
Sıcaklık Muamelesi x Eksplant	2	1.167	4.514 *
Ön muamele x Eksplant	6	0.463	1.791
Sıcaklık Muamelesi x Ön Muamele x Eksplant	6	0.426	1.648
Hata	46	0.258	
Genel Toplam	71		
* 0.05. **0.01 düzeyinde önemlidir. ö.d.: önemli değil			

Çizelge incelendiğinde 3. popülasyonda rejenere bitki sayısı bakımından ön muamele ve explant uygulamaları arasında istatistiki olarak %1 önem seviyesindedir. Sıcaklık muamelesi ve sıcaklık muamelesi x eksplantlar arasında ise %5 önem seviyesinde farklılıklar tespit edilmiştir.

Tablo 22: 3.Melez Popülasyonundan Elde Edilen Rejenere Bitkilerin İstatistiksel Verileri Tablosu.

CuSO ₄ (mg/l)	Ortam Sıcaklığı								Genel Ort.
	+4 °C				+28 °C				
	Başak Eksplantı (adet)								
	Alt	Orta	Üst	Ort.	Alt	Orta	Üst	Ort.	
0	1,66	2,66	1,66	1,99	1,33	2,33	1,33	1,66	1,83a
1	0,66	1,33	0,66	0,88	1,00	0,66	0,00	0,89	0,72bc
5	0,33	1,66	0,33	0,77	0,33	0,33	1,00	0,55	0,66c

10	0,33	2,00	1,00	1,11	0,66	1,33	1,00	1,00	1,05b
EKS-Ort	0,75b	1,91a	0,91b	-----	0,83b	1,16b	0,83b	-----	1,07
Sıcak Ort.				1,19a				0,94b	

3. popülasyonda rejenere bitki sayıları sıcaklık muamelelerinde 1.19-0.94 adet, eksplantlar arasında 1.91-1.16 adet, küprik uygulamalarında 1.83-0.66 adet arasında bulunmuştur.

3. popülasyonda sıcaklık muamelelerine göre en yüksek kallus sayısı (1.19 adet) 4°C’de elde edilmiştir. Eksplantlara göre ise 4°C en yüksek kallus sayısı başakların ortalarından alınan anterlerden (1.91 adet) elde edilmiştir. Küprik uygulamaları arasında ise en yüksek kallus sayısı ise 1.83 adet ile küprik uygulanmayan anterlerde tespit edilmiştir.

3.4. PLOİDİ ANALİZ CİHAZI İLE ELDE EDİLEN BİTKİCİKLERİN KROMOZOM KATLANMASININ TESPİTİ

3.4.1. Çalışmada Kullandığımız Ploidi Cihazı ve Kullanım Talimatı

İklim odalarında viyollarda gelişimlerini tamamlayıp dört yapraklı hale gelen arpa bitkisinde kromozom katlanmasının olup olmadığını orta koymak için ‘SYSMEX’ marka ploidy analiz cihazında, cihazın kitleri ile DAPİ boyası ile boyama yapılmıştır. Bu yöntem için yeni sürgün yapraklardan 1 cm uzunluğunda parça kesilip, 400 µl solüsyon eklenerek büstri ile sert darbelerle ezmeden kesilmiştir. Filtreli tüplere otomatik pipet ile çekilip üzerine 800 µl DAPİ boyası eklenmiş ve cihaza uyumlu tüple birlikte ölçüm için cihaza takılmıştır.

3.4.2. Ploidi Cihazı ve Yöntemin Amacı

‘2n’ kromozoma sahip gerçek bitkilerden alınan ‘n’ kromozom sayısına sahip erkek üreme organı olan anterin, kullanılan anter kültürü yöntemi uygulamalarıyla ve besi yeri besin maddelerinin sayesinde tekrar ‘2n’ kromozom sayısına sahip, tohum oluşturabilme kabiliyeti olan bitkinin oluşup oluşmamasının tespittir.

3.4.3. Ploidi Analizi Verileri

Yapmış olduğumuz çalışmada; morfolojik olarak haploide benzer bitkicikler öncelikli olmak üzere diğer tüm bitkiciklere ploidi analizi yapılmış ve bu bitkilerden 11 tanesi haploid olarak tespit edilmiştir.

1.popülasyon için 30 adet, 2.polüasyonda 23 ve 3.popülasyonda da 25 olmak üzere toplamda 78 adet bitkicik için ploidi analizi yapıldı. Bunlardan 68 tanesi ‘2n’ kromozom frekans değerlerinde çıkmış ve herhangi bir işleme (kolşisin vs.) gerek kalmamıştır. Ploidi analizine göre, ‘n’ kromozom değerlerine sahip haploid bitkiciklere “kolşisin (colchicine)”

uygulanıp morfolojik olarak takibine başlanmıştır. Kolşisin (Colchicine) haplid ‘n’ kromozomlu bitkilerin ‘2n’ kromozoma katlanması için uygulanan bir bileşittir (Hansen and Anderson 1998; Redha et al. 1998; Shahinul Islam 2010).

Tablo 23: ‘Ploidi Analiz’ Sonuçlarına Göre; 1.,2. ve 3. Melez Popülasyonlardan Elde Edilen Rejenere Bitkilerden Spontan Kromozom Katlanması Olmayan ‘n’ Kromozom Sayısına Sahip (Double Haploid= 2n) Bitkilerin, Sayı Verileri Tablosu.

CuSO ₄ (mg/l)	Kolşisin Uygulanan Haploid Bitkiler (Adet)		
	1.Popülasyon	2.Popülasyon	3.Popülasyon
0	2	1	1
1	0	1	1
5	1	0	1
10	1	1	1

Her bir popülasyon ve küprik dozu bakımından istatistik olarak önem arz etmeyen bir değere sahip olan ‘n’ kromozomlu haploid bitki adetleri tabloda gösterildiği gibi sonuçlanmış olup toplam bitki sayısının, haploid bitki sayısı oranı %67.08 sonuçlanmıştır (78 adet toplam bitki / 11 adet haploid bitki sayısı).

TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Tartışma

Bitkiler yaşamlarını devam ettirebilmek için bulundukları yere iyi adapte olması gerekmektedir. Bitki bulunduğu çevre koşullarında birtakım biyotik ve abiyotik stres faktörlerine maruz kalırsa bitki gelişimi olumsuz etkilenecek yaşam süreci tehlikeye girecektir. Stres faktörlerinin olumsuz etkilerini minimize edebilmek için ortamın iyileştirilmesinin yanı sıra stres faktörlerine (kuraklık, don, hastalık ve zararlılar gibi) karşı dayanıklı üstün özellikli bitki çeşitlerinin ıslah edilmesi oldukça önemli konulardan bir tanesidir (Büyük vd., 2012).

Son dönemde yaşanan iklim değişikliğinin arpa bitkisinde nasıl ve ne düzeyde etki edeceği bilinmemekle birlikte, arpa yetiştiriciliği yapılan kuru tarım alanlarında yüksek sıcaklık artışlarının üretimi ciddi anlamda tehdit edeceği düşünülmektedir (Yüksel ve Akçura 2022). Gelecekte oluşabilecek bir takım stres faktörlerine karşı dayanım gösterebilecek arpa çeşitlerinin ıslah edilmesi bu yönden oldukça önemli hale gelmektedir. Klasik ıslah metotları ile diğer bitkilerde olduğu gibi yeni arpa çeşitleri elde etmek bir hayli zor ve uzun bir zaman almaktadır. Son dönemde klasik ıslah metodunu tamamlayıcı olarak yapılabilecek yöntemlerden birisi olan anter kültürü tekniği ile double haploid bitki sayesinde %100 saf homozigot hatlara kısa sürede ulaşılarak yeni çeşitlerin ıslah çalışmalarını hızlandırmakta ve kolaylaştırmaktadır (Başer vd., 2016).

Wojnarowicz vd. 2002 yılında yaptıkları çalışmada kışlık arpa çeşidi olan Igri’de anter kültürü uygulamalarında küprik sülfatın etkisini araştırmışlardır. Yaptıkları çalışmada $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ’ın (1, 2, 5, 7, 10, 12, 15, 18, 20 μM) 9 farklı dozunu ön muamele ortamına ekleyerek denemeler yapmışlardır. Daha sonra rejenerasyon ortamı için $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ’ın 4 farklı dozunu (5, 10, 15, 20 μM) kullanmışlardır. Ön muamele ve kültür ortamına eklenen $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ’ın 5 ve 18 μM dozları arasında %73,6 oranında anter kültürüne cevap olarak artış gözlenmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırma yapıldığında androgenesis için en etkin doz oranının 10 μM olduğu belirlenmiştir.

Bu yapılan çalışmada ise sırasıyla 1. popülasyonda 1,83 adet ile kontrol grubu, 2. popülasyonda 1,55 adet ile kontrol grubunda ve 3. popülasyonda ise 1,83 adet ile yine kontrol grubu küprik sülfat dozunda en yüksek rejenerasyon değerine ulaşılmıştır. Rejenere bitki oluşturma bakımından ikinci en yüksek değerleri veren küprik grubu ise 10 doz olarak 1. popülasyonda 1,16, 2. Popülasyonda 0,86 ve 3. Popülasyonda 1,05 olarak tespit edilmiştir.

Daha önce çalışılmış bir deneyde başak eksplantlarının birbirine farklılıkları incelenmiş ve arpa bitkisinin orta kısımlarında alınan anterlerin, haploid bitki üretimi için en uygun eksplant olduğu görülmüştür (Huang ve Sunderland 1982, Powell 1988).

Çalışmamızda en yüksek kallus sayısı ortalama olarak 1. melez popülasyonda uç kısımdan alınan ($+4^{\circ}\text{C}$ 'de 5.08 ve $+28^{\circ}\text{C}$ 'de 4.42 adet) anterlerden elde edilmişken, 2. melez popülasyonda orta kısımdan alınan anterlerden ($+4^{\circ}\text{C}$ 'de 3.66 ve $+28^{\circ}\text{C}$ 'de 2.58 adet), 3. melez popülasyonda ise istatistiki fark olmamasına rağmen uç kısımdan alınan anterlerden ($+4^{\circ}\text{C}$ 'de 3.75 adet) elde edilmiştir.

Sürgün sayısına baktığımızda eksplant bakımından 1. melez popülasyondan sürgün sayısı en fazla $+4^{\circ}\text{C}$ 'de alt (2.58 adet) ve uç kısımlardan (2.58 adet) elde edilmesine rağmen ikisi arasında istatistiki bir fark bulunmamıştır. 2. melez popülasyonda $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 2.00 adet ile orta eksplant, $+28^{\circ}\text{C}$ 'de istatistik fark olmayan alt (1.42 adet) ve orta (1.41 adet) kısımdan elde edilmiştir. 3. melez popülasyonda istatistiki fark olmayan sırasıyla $+4^{\circ}\text{C}$ 'de alt (1.92 adet), orta (2.25 adet) ve uç (2.25 adet) eksplantlardan elde edilmiştir. $+28^{\circ}\text{C}$ 'de ise alt (2.08 adet) ve uç (1.83 adet) eksplantlar başarılı olmuştur.

Cistue vd. (1999) tarafından yapılan çalışmada arpa çeşitleri materyal olarak kullanılmış ve ön muameleler ile besi yeri ortamlarına ilave edilen kimyasalların, haploid bitki eldesine etkileri incelenmiştir. Ön muamele besi yeri olan Mannitol ortamının, anter kültürüne tepkisi az olan genotipler üzerine soğuk ön uygulamasına oranla daha başarılı olduğu ortaya konmuştur.

Çalışmada mannitol besi yerine ilave edilen kübrik sülfatın kallus oluşturma bakımından üç farklı melez kombinasyona sahip arpa bitkisinde araştırma yapılmıştır. 1. melez popülasyonda en yüksek kallus kontrol grubunda 6,67 adet, 2. melez popülasyonda kontrol grubunda 5,66 adet ve 3. melez popülasyonda ise yine 5,00 adet ile kontrol grubunda en yüksek sayıda kallus gözlemlenmiştir. Kontrol grubundan sonra en yüksek kallus sayısı veren kübrik sülfat konsantrasyonları 1. melez popülasyonunda 5mg/L (4,89 adet), 2. melez popülasyonunda 10 mg/L (2,61 adet), 3. melez popülasyonunda ise 10 mg/L (3,50 adet) olarak belirlenmiştir.

Kruczkowska vd. (2002), genotip olarak anter kültüründe başarılı olan Igri ve üç farklı genotipteki arpa çeşitlerinin $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 21 gün bekletilmesiyle kallus oluşumunun arttığı sonucuna varmıştır.

Melez popülasyonları arasındaki bu farklılıklar, farklı değişkenlere sahip ön muamele, besi yeri ortamlarının ve genotiplerin anter kültürüne etkisini göstermektedir. Al-Ashkar tarafından 2013 yılında yapılan çalışmada birbirinden farklı 5 ekmeklik buğday çeşidinde, 4

farklı besi yeri ortamı kullanmış ve genetik farklılıkların çalışmada çok etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Çalışmada ön muamele olarak +4°C (Szarejko ve Kasha (1991) ve +28°C (Hassawi ve Liang, 1990) sıcaklıklar kullanılmıştır. 1. 2. ve 3. melez popülasyonunda ortalama olarak en yüksek kallus sayısı +4°C 'de sırasıyla 4,83 adet, 3,41 adet ve 3,69 adet olarak tespit edilmiştir. En fazla sayıda sürgün oluşumu +4°C'de 1. melez popülasyonundan 3. melez popülasyona kadar sırasıyla 2,52; 1,63 ve 2,14 adet olarak gerçekleşmiştir.

Rejenere bitki bakımından sıcaklık farklılıklarına bakıldığında en fazla sayıda rejenere bitki sayısı +4°C'de 1. (1,27 adet) ve 2. (1,19 adet) melez popülasyonundan elde edilirken, en düşük rejenere bitki sayısı ise +28°C'de 3. (0,86 adet) melez popülasyondan elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar istatistiki olarak değerlendirildiğinde 1. ve 2. Melez popülasyonları önemsiz iken, 3. melez popülasyonu $P>0,05$ seviyesinde önemli çıkmıştır.

Sonuç

Çalışmada Ankara Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü'nde melez çalışmalarında kullanılan 3 farklı genotiplere sahip melez kombinasyonları materyal olarak kullanılmıştır. Uygun koşullarda alınan arpa başakları, bitki yüzey sterilizasyonu için %70 oranındaki etanol ile steril edilmiş ve başaklar steril kabinler içinde alt-orta-uç eksplantndan erkek üreme organı olan anterler, kallus teşvik ortamı olan 1M Mannitol besi yeri ortamına alınmış ve +4°C buzdolabı ile +28°C inkübatöre konulmuştur.

4 gün sonra 4 farklı konsantrasyona sahip Küprik-BakırII Sülfat (CuSO_4) dozlarının (kontrol grubu, 1, 5, 10) oldu kallus oluşturma ortamına alınmış ve +4°C'den çıkanlar +4°C'e, +28°C'lik inkübatörden çıkan anterler ise kallus oluşturma ortamına aktarıldıktan sonra +28°C'lik inkübatöre alınıp kallus oluşumu gözlenmiştir (minimum 21 günde kallus oluşmaya başlamaktadır). Kallus olumu bakımından genotip farklılığının büyük ölçüde etkilendiği çalışmada en yüksek kallus sayısına 5.72 adet ortalama ile 1. melez popülasyonunda (Tokak 157-37 X Aida X Sayım 40) ulaşılmıştır.

Kallus oluşumundan sonra kallus geliştirme besi yeri ortamına aktarılan kalluslardan yeşil kallus oluşumu gözlenmiştir. Steril koşullarda devam eden çalışmada yeşil kalluslardan, köksüz sürgünler meydana gelmiştir. Genotip farklılıklarının sürgün elde edilmesinde yine çok etkili olduğunu belirterek en fazla sayıda sürgün, 1.melez popülasyonunda (Tokak 157-37 X Aida X Sayım 40) 3.27 adet ve 3. melez popülasyonunda (Cirit X Alena) 3.11 adet olarak bulunmuştur.

Köklendirme besi yeri ortamına alınan yeşil sürgünlerden köklü bitkicikler gözlemlenmiştir. Sterilizesini bozmadan köklerin gelişmesi beklenmiştir. Bu aşamada fotoperiyod çok önemlidir. 8 saat karanlık ve 16 saat aydınlık ile 25°C’de iklim dolaplarında, köklendirme besi yeri ortamında bekleyen sürgünlerden, köklü rejenere olmuş bitkiler gözlemlenmiştir. Farklı genotiplere sahip melez popülasyonlardan; 1. melez popülasyonda (Tokak 157-37 X Aida X Sayım 40) 1.83 adet, 2.melez popülasyonda (Sayım 40 X Tokak 157-37) 1.55 adet ve 3.melez popülasyonda (Cirit X Alena) 1.83 adet rejenere olmuş bitki elde edilmiştir. Tüm genotiplerden toplam 78 adet bitki elde edilmiştir Elde ettiğimiz bitkileri 2-4 yapraklı hale gelince, Ploidi Analiz cihazı ile analiz edilmiştir.

Sonuç olarak çalışmada arzu edilen ‘n’ kromozomlu anterden, ‘2n’ kromozoma katlanmış toplam bitki sayısı 68 bulunmuştur. 11 adet ‘n’ kromozomlu haploid bitkiden ‘2n’ kromozomlu diploid bitki elde etmek için, kromozom katlanmasını teşvik eden kolşisin bileşeni uygulanıp morfolojik olarak takibi yapılmış ve 11 bitkinin de tohum bağlama kapasitesine sahip ‘2n’ kromozomlu tam bir bitki elde edilmiştir. Bu uygulama ile birlikte çalışmada rejenere olan bitki ile doublehaploid bitki oranı % 100 olarak sonuçlanmıştır.

Öneriler

Yapılan doku kültürü çalışmalarından anter kültürü ile haploid bitki elde edilmesi, 1 yıl gibi kısa bir sürede %100 homozigot saf hat geliştirme bakımından son derece önemlidir. Moleküler çalışmalar ve hastalık testlemeleri için materyal sağlayıcı bu yöntem ile çevre koşullara bağlı kalmadan yılın her zamanı aktif olarak çalışılabilmektedir. Genetik varyasyonların, klasik ıslah çalışmalarına da katkı sağladığı unutulmamalıdır.

Çalışmada katkıda bulunmaya çalışılan anter kültürü protokolü, çalışmanın sonuçlarında da ortaya konulduğu üzere, genotipe göre farklılıklar göstermektedir. Orta Anadolu Bölgesi’ne uyumlu çeşitlerden melezlenen 3 farklı kombinasyona sahip arpa bitkisi materyaline uygun olan anter kültürü protokolü, çeşitlere ve türlere göre farklılıklar göstermelidir. Bunun için ön çalışmalar çok fazla önem arz etmektedir. Kübrik Sülfat konsantrasyonlarının denendiği çalışmada ek olarak; çeşitli dozlarda Gümüş Nitrat ve hormon gibi değişkenler ile ön muamele uygulamaları farklı çalışmalarda araştırılmalı ve bu araştırmalar bir sonraki çalışmalara örnek teşkil etmelidir.

Klasik bitki ıslahına ek olarak anter kültürü, ovaryum kültürü, ısıtılmış polen ile mutasyon ıslahı, embriyo kültürü, mikroçoğaltım yöntemleri, moleküler-genetik karakterizasyon uygulamaları da çalışılmalı ve klasik ıslah ile entegre olmalıdır. Bu çalışmada metod olarak kullandığımız anter kültürü ile 1 yıla düşürülen saf hat geliştirmeye ek, yapılacak

moleküler çalışmalar ile gen haritalama, genetik karakterizasyon ve akrabalık ilişkileri de araştırılarak ülke isteklerine uygun bitkilerin (eřit veya tür olabilir) geliştirilmesi sağlanacağı kanatindeyiz.



KAYNAKÇA

- Alkan, R.F., & Kandemir, N. (2015). Tokak Yerel Arpa Çeşidi İçinden Seçilen Saf Hatların Bazı Gıda, Yem ve Tarımsal Özellikler Bakımından Varyasyonları. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 2015, 24 (2):124-139.
- Altındal, N., & Akgün, İ. (2019). Çavdarda (*Secale cereale L.*) Anter Kültür ile Kallus Oluşumu Ve Bitki Rejenerasyonu Üzerine Genotip, Soğuk Uygulama ve Besi Ortamlarının Etkisi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (16), 559-566.
- Anonim (2016). T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, *Master Planı* (2016-2020), ANKARA-2016.
- Anonim, (2023). Tarım Kütüphanesi Arpa Yetiştiriciliği
http://www.tarimkutuphanesi.com/ARPA_YETISTIRICILIGI_00032.html
ErişimTarihi:23.05.2023
- Asadi, A., & Zebarjadi, A., & Abdollahi, M.R., & Seguí-Simarro, J. M. (2018). *Assessment of Different Anther Culture Approaches to Produce Doubled Haploids in Cucumber (Cucumis sativus L.)*. *Euphytica*, 214(11), 216.
- Ata, A., (2011). *Biberlerde (Capsicum annuum L.) Anter Kültüründe Mevsim Etkisi Ve Mikrospor Gelişimi*. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, 89.
- Başer, İ., Korkut, K.Z., Bilgin, O., & Balkan, A. (2016). Anter Kültürü Tekniği ile Ekmeklik Buğday (*Triticum aestivum L.*) Melez Populasyonlarından Doubled Haploid Bitkilerin Elde Edilmesi. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 25(Özel Sayı-1), 232-236.
- Bhojwani, S.S., & Razdan, M.K., “Plant Tissue Culture Theory and Practice” Elsevier Science Publishers B.V., Netherlands, 1983
- Birecikli, A. H., & Akbaş, F., (2018), “Balcı” Aspir (*Carthamus tinctorius L.*) Çeşidinin İn Vitro Sürgün Uçlarının Mikroçoğaltımı ve Köklendirilmesi Üzerine Oksin ve Sitokininlerin Etkisi, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 28(4), 438-443.
- Büyük, İ., Soydam-Aydın, S., & Aras, S. (2012). Bitkilerin Stres Koşullarına Verdiği Moleküler Cevaplar. *Turkish Bulletin of Hygiene & Experimental Biology/Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji*, 69(2), 97-110.
- Cistué, L., Cuesta-Marcos, A., Chao, S., Echávarri, B., Chutimanitsakun, Y., Corey A., Filichkina, T., Garcia-Mariño, N., & Romagosa, I. and Hayes, P.M. (2011). Comparative Mapping of the Oregon Wolfe Barley Using Doubled Haploid Lines Derived From Female and Male Gametes. *Theor Appl Genet.* 2011 May;122(7):1399-410.
- Cistué, L., Ramos, A., Castillo, A.M. and Romagosa I. (1994). Production of Large Number of Double Haploid Plants From Barley Anther Pretreated With High Concentrations of Mannitol, *Plant cell reports*, 13, 709-712
- Çakmak, E., Uncuoğlu, A.A., & Aydın, Y. (2019). Evaluation of İn Vitro Genotoxic Effects Induced By İn Vitro Anther Culture Conditions in Sunflower. *Plant Signaling & Behavior*, 14(9), 1633885

- Çeliksaş, N., & Hatipoğlu, R. (1997). Arpa (*Hordeum vulgare* L.) Anter Kültüründe Genotip, Soğuk Uygulama Süresi ve Besi Ortamı 2,4-D İçeriğinin Etkisi, *Ç. Ü. Z. F. Dergisi*, 12 (2): 163-172.
- Dağüstü, N. (2002). Factors Affecting the Anther Culture of Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biotechnology&Biotechnological Equipment*.
- Daniel, G. (1993). Anther Culture in Rye: Improved Plant Regeneration Using Modified MS-Media, *Plant Breeding*, 110, 259-261.
- Dhia S. Hassawi., & G. H. Liang. (1990). Effect of Cultivar, Incubation Temperature, and Stage of Microspore Development on Anther Culture in Wheat and Triticale. *Plant breeding*, Volume105, Issue4. Pages 332-336.
- Diker, M.M., & Şan, B. (2016). Gerberanın (*Gerbera jamesonii* Bolus) Yaprak ve Yaprak Sapından İn Vitro Adventif Sürgün Rejenerasyonu. *Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 11(1), 104-111.
- Fadel, F., & Wenzel, G. (1990), Medium-Genotype-Interaction on Androgenetic Haploid Production in Wheat, *Plant Breeding*, 105: 278-282.
- FAO, (2020). <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> . Erişim Tarihi: 17.03.2022
- Flehinghaus, T., Deimling, S., & Geiger H.H., (1991), Methodical Improvements in Rye Anther Culture. *Plant Cell Reports*, 10: 397-400.
- Foster, B.P., Touraev, A. & Jain, S.M. (2009). Advances in Haploid Production in Higher Plants, 12 110.
- Ghasempour, H., Soheilikhah, Z. ,Zebarjadi, A.R., Ghasempour,S., & Karimi,N., (2014), *In Vitro Micro Propagation, Callus Induction and Shoot Regeneration in Safflower* L. cv. Lesaf, 4(2), p.999-1004.
- Grauda D., Miélsone A., Īisina N., Pagata K., Ornicāns R., Fokina O., Lapiņa L., & Rashal I. (2014). Anther Culture Effectiveness in Producing Doubled Haploids of Cereals. *Proceedings of the latvian academy of sciences*. Section B, Vol. 68 (2014), No. 3/4 (690/691), pp. 142–147. doi: 10.2478/prolas-2014-0016.
- Guha, S. & Maheshwari, S.C. (1964). In Vitro Production of Embryos From Anthers of *Datura*. *Nature* 204: 497–498.
- Han Y., Broughton S., Liu L., Zhang X.-Q., Zeng J., He X., & Li C. (2021). Highly Efficient and Genotype-Independent Barley Gene Editing Based on Anther Culture. *Plant Comm.* 2, 100082.
- Hooghvorst, I., Ramos-Fuentes, E., López-Cristofannini, C., Ortega, M., Vidal, R., Serrat, X., & Nogués, S. (2018). Antimitotic and Hormone Effects on Green Double Haploid Plant Production Through Anther Culture of Mediterranean Japonica Rice. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 134(2), 205-215.
- Huang, B. & Sunderland, N. (1982). *Temperature-stress Pretreatment in Barley Anther Culture*. *Ann. Bot.*, 49: 77-88.
- Immonen, S. (1999). Androgenetic Green Plants from Winter Rye (*Secale cereale* L.) of Diverse Origin, *Plant Breeding*, 118, 319-322.
- Jacquard, C., Asakaviciute, R., Hamalian, A.M., Sangwan, R.S., Devaux, P. & Clément, C. (2006). Barley Anther Culture: Effects of Annual Cycle And Spike Position on Microspore Embryogenesis and Albinism, *Plant Cell Rep.*, 25:375- 381.

- Kahrızı, D., Mahmoodi, S., Bakhshi Khaniki G. & Mirzaei, M. (2011). Effect of Genotype on Androgenesis In Barley (*Hordeum Vulgare L.*) *Biharean Biologist* 5(2): pp.132-134.
- Kasha, K.J., Simion, E., Oro, R. & Shim, Y.S. (2003). Barley Isolated Microspore Culture Protocol. in: Maluszynski, M., Kasha, K.J., Forster, B.P. And Szarejko, I. (Eds). Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual. Kluwer, Dordrecht, Netherlands, pp 43-47.
- Kaya, Z. (1988) "Doku Kültürünün Orman Ağaçları Islah Çalışmalarındaki Yeri" *Orman Müh. Dergisi*, 25, 5, 12-19,
- Knudsen, S., Due, I.K. & Andersen, S.B. (1989). Components of Response in Barley Anther Culture. *Plant Breeding*, 103, 241-246.03-309.
- Kruczkowska, H., Pawłowska, H., & Skucińska, B. (2002). Influence of Anther Pretreatment on The Efficiency of Andro And Genesis in Barley, *J. Appl. Genet.*, 43(3): 287-296.
- Kün, E. (1996). Tahıllar-1 (Serin İklim Tahılları). *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları*, Yayın No:1451. Ankara. 332 s.
- Lazaridou, T., Sistanis, I., Lithourgidis, A., Ambrus, H. & Roupakias, D. (2011).. Response to İn-Vitro Anther Culture of F3 Families Originating From High and Low Yielding F2 Barley (*Hordeum Vulgare L.*) Plants. *AJCS* 5(3):265-270 ISSN:1835- 2707.
- Lezin, F., Sarrafi, A. & Alibert, G. (1996). The Effects of Genotype, Ploidy Level and Cold Pretreatment on Barley Anther Culture Responsiveness, *Cereal- Research Communications*, 24: 1, 7-13. 128.
- Nevo, E. (2012). Evolution of Wild Barley and Barley Improvement. 11. *Barley Genetics Symposium*. April 15-20. Hangzhou, China.
- Powell, W. (1988). The Influence of Genotype and Temperature Pretreatment on Anther Culture Response in Barley (*Hordeum vulgare L.*), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 12: 291-297.
- Rezaei, F., Isik, S., Kartal, M., & Erdem, S. A. (2018). Effect of Priming on Thymoquinone Content and İn Vitro Plant Regeneration With Tissue Culture of Black Cumin (*Nigella Sativa L.*) Seeds. *Journal of Chemical Metrology*, 12(2), 98.
- Robert Mihaly, Peter Fonad, Andras Palagyı, Lajos Bona, Csaba Lantos & Janos Pauk (2014). *Review on Agriculture and Rural Development* vol. 3 (1) ISSN 2063-4803.
- Roberts-oehlschlager, S.I. & Dunwell, J.M. (1990). Barley Anther Culture: Pretreatment on Mannitol Stimulates Production of Microspore-Derived Embryos, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 20, 235-240.
- 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.
- Savaşkan, Ç., Szarejko, I. & Toker, M.C. (1999). Callus Production and Plant Regeneration from Anther Culture of Some Turkish Barley Cultivars, *Turkish Journal of Botany*, 23, 359-365.
- Sriskandarajah, S., Sameri, M., Lerceteau-Köhler, E. & Westerbergh, A. (2015). Increased Recovery of Green Doubled Haploid Plants from Barley Anther Culture. *Crop Science*. Vol. 55 No. 6, p. 2806-2812.
- Srivastava, P. S. & Steinbaver, A., (1981). "Regeneration of Birch Plants Catkin Tissue Cultures", *Plant Science Letters*, 22.

- Szarejko, I. & Kasha, K. J. (1991). Induction of Anther Culture Derived Double Haploids in Barley, *Cereal Res. Commun.*, 19 (1-2): 212-237.
- Taşkın, H., Büyükalaca, S., Keleş, D., & Ekbiç, E., (2011). Induction of Microspore-Derived Embryos by Anther Culture in Selected Pepper Genotypes. *African Journal Of Biotechnology*. 10(75): 17116-17121.
- Tripathy, S.K., Swain, D., Mohapatra, P.M., Prusti, A.M., Sahoo, B., Panda, S., & Behera, S.K. (2019). Exploring Factors Affecting Anther Culture in Rice (*Oryza Sativa L.*). *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 7(2), 87-92.
- TÜİK, 2022. <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr>.
- Vidalie, H., (1986). “*In Vitro Culture and Its Applications in Horticulture*” *Economic Botany*, 51, 1, 92-93.
- Wojnarowicz G., Jacquard C., Devaux P., Sangwan R.S., & Clément C.(2002). Influence of Copper Sulfate on Anther Culture in Barley (*Hordeum Vulgare L.*). *Plant Science* 162 (2002) 843 /84.
- Yıldırım, M.B., Yıldırım, Z. & Çaylak, Ö. (1990). Patateste Anter Kültürü Yoluyla Haploid Elde Edilmesi, *Doğa Tr. J. of Agriculture and Forestry Tübitak*, 14, 543-554.
- Yüksel, K. & Akçura, M. (2022). İklim Değişiminin Farklı Büyüme Tabiatına Sahip Bazı Arpa Çeşitleri Üzerine Etkisi. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 9(1), 107-118.
- Zhao, J., Zou, X., Zhang, Z., Yang, B., & Zhou, S., (2010). Influences of Carbon Sources And Plant Growth Regulators on Anther Culture Efficiency of Pepper. *Agricultural Science & Technology*, 11(4): 102-105.

ÖZGEÇMİŞ

..... ilinin ilçesinin ~~Sıhhiye~~ semtinde doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Ankara'da tamamladı. 2007 yılında memuriyet hayatına başladı. 2007 yılında Hacettepe Üniversitesi Sağlık Yüksek Okulu'nda Tıbbi Laboratuvar Bölümü'nden mezun oldu. 2013 yılında Anadolu Üniversitesi İşletme Bölümü'nden mezun oldu. 2018 yılında Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümünü' den mezun oldu. Memuriyet hayatı boyunca Ankara ilinde görev yapmış ve halen Ankara ilinde görevine devam etmektedir. 2020 yılında başladığı Yüksek Lisans Eğitimi' ne Bayburt Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Organik Tarım İşletmeciliği Anabilim Dalı' nda devam etmektedir. Evli ve 2 çocuk babasıdır.

