

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**BUĞDAYDA (*TRITICUM AESTIVUM* L.) *IN VITRO* ANDROGENESİS VE
SOMATİK EMBRİYOGENESİS**

Ahmad Ratib SHARAFAT

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

TEMMUZ 2024

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**BUĞDAYDA (*TRITICUM AESTIVUM* L.) *IN VITRO* ANDROGENESİS VE
SOMATİK EMBRİYOGENESİS**

Ahmad Ratib SHARAFAT

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

TEMMUZ 2024

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BUĞDAYDA (*TRITICUM AESTIVUM* L.) *IN VITRO* ANDROGENESİS VE
SOMATİK EMBRİYOGENESİS

Ahmad Ratib SHARAFAT
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

TEMMUZ 2024

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BUĞDAYDA (*TRITICUM AESTIVUM* L.) *IN VITRO* ANDROGENESİS VE
SOMATİK EMBRİYOGENESİS

Ahmad Ratib SHARAFAT
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Bu tez 31.07.2024 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr.Esin ARI (Danışman)
Prof. Dr. Nedim MUTLU
Prof. Dr. Taner AKAR
Prof. Dr. Serpil TANGOLAR
Prof. Dr. Kamil HALİLOĞLU

Bu belge, güvenli elektronik İmza ile imzalanmıştır.

Evrak sorgulaması <https://turkiye.gov.tr/ebd?eK=5543&eD=BSNMR6JZ1Z&eS=576> adresinden yapılabilir. (PIN:73392)

ÖZET

BUĞDAYDA (*TRITICUM AESTIVUM* L.) *IN VITRO* ANDROGENESİS VE SOMATİK EMBRİYOGENESİS

Ahmad Ratib SHARAFAT

Doktora Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Esin ARI

Temmuz 2024; 154 sayfa

Buğday (*Triticum aestivum* L.), dünyadaki en önemli temel gıda maddelerinden birisi olup, farklı coğrafi koşullarda 17.000'den fazla çeşidi yetiştirilmektedir. Günümüzde özellikle iklim değişikliklerinden kaynaklı koşullar başta olmak üzere çeşitli abiyotik koşulların yanı sıra biyotik stres koşullarına dayanıklı buğday çeşitlerinin geliştirilmesi hayati önem taşımaktadır. *In vitro* androgenesis ve somatik embriyogenesis teknikleri buğday ıslahı ve yetiştiriciliğini hızlandıran en önemli biyoteknolojik yöntemler arasındadır.

Araştırma temel olarak androgenesis ve somatik embriyogenesis çalışmaları olmak üzere iki ana gruptan oluşmaktadır. Bu çalışmalarda hem ekmeklik (*Triticum aestivum* L.) hem de makarnalık (*Triticum turgidum* Desf.) bazı yazlık ve kışlık buğday çeşitlerinde, yüksek sayıda haploid/doubled haploid bitkilerin androgenesis yoluyla (mikrospor ve anter kültürü ile) üretilmesi için gerekli ortam protokollerinin geliştirilmesi ve aynı zamanda skutellum ve yaprak eksplantları kullanılarak yüksek etkinlikte somatik embriyogenesis protokollerinin oluşturulması amaçlanmıştır. Bu protokollerin oluşturulabilmesi için mikrospor embriyogenesisi ve somatik embriyogenesis süreçlerini etkileyen önemli bazı faktörlerin (genotip, eksplant, indüksiyon ve rejenerasyon ortamları) embrioid/embriyo ve sürgün/bitki oluşumu üzerine etkileri araştırılmıştır.

Bitkisel materyal olarak 3 grup altında yürütülen androgenesis denemelerinde ekmeklik buğdayda Altındane, Dariel, Pehlivan, Ceyhan-99, Sagittario, Bayraktar ve Esperia, makarnalık buğdayda ise Svevo, Sarıçanak, Eminbey ve Kiziltan çeşitleri kullanılmıştır.

Androgenesis çalışmalarının I., II. ve III. grup denemelerinde yukarıdaki bazı genotiplerin orta ila geç tek çekirdekli safhadaki mikrosporlarını içeren anter ve mikrospor kültürlerinde sırasıyla 5, 18 ve 8 farklı indüksiyon ortamı test edilmiştir. 4 grup altında yürütülen ve Ceyhan-99, Sagittario, Svevo ile Sarıçanak genotiplerinin kullanıldığı somatik embriyogenesis çalışmalarının I., II. III. ve IV. grup denemelerinde ise her genotipin skutellum ve yaprak eksplantlarının her birisi 9’ar indüksiyon ortamında kültüre alınmıştır. İndüksiyon ortamları; karbonhidrat kaynağı maltoz veya sukroz olan farklı temel besin ortamlarına farklı tip ve konsantrasyonlarda bitki gelişim düzenleyicileri, glutamin, arabinogalaktan, ve timentin, gibi kimyasalların eklenmesiyle oluşturulmuştur. İndüksiyon ortamlarında oluşan yapılar ise bitkiye dönüştürülmek üzere farklı rejenerasyon ortamlarında kültüre alınmıştır.

Tezin androgenesis deneme sonuçları; buğdayda embriyoid indüksiyonu, rejenerasyonu, albino ve yeşil bitki üretimi gibi androjenik tepkilerde genotip, ve indüksiyon ortamı faktörlerinin önemini ortaya koymuştur. Genel olarak çalışmada mikrospor kültüründen anter kültürüne göre daha fazla embriyoid elde edilmiştir.

Tezin somatik embriyogenesis deneme sonuçlarında ise ekmeklik buğday genotipleri, somatik embriyogenesisin incelenen tüm parametrelerinde makarnalık buğday genotiplerinden daha üstün performans göstermiştir. Eksplant kaynağı yönünden skutellum eksplantları; kallus üretimi, embriyojenik kallus üretimi, kallus boyutu, yeşil nokta, kallus başına sürgün ve rejenerant bitki oluşumu açısından yaprak eksplantına kıyasla daha yüksek tepki göstermiştir. Yaprak eksplantları ise daha ağır kalluslar üretmiştir, ki bu sonuç *in vitro* sekonder metabolit üretimi için potansiyel olarak yararlı olabilir.

ANAHTAR KELİMELER: Androgenesis, Arabinogalaktan, Somatik embriyogenesis, Rejenerasyon, *Triticum aestivum* L., *Triticum durum* Desf.

JÜRİ: Prof. Dr. Esin ARI

Prof. Dr. Nedim MUTLU

Prof. Dr. Taner AKAR

Prof. Dr. Serpil TANGOLAR

Prof. Dr. Kamil HALİLOĞLU

ABSTRACT

***IN VITRO* ANDROGENESIS AND SOMATIC EMBRYOGENESIS IN WHEAT (*TRITICUM AESTIVUM* L.)**

Ahmad Ratib SHARAFAT

PhD Thesis in Agricultural Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Esin ARI

July 2024; 154 pages

Wheat (*Triticum aestivum* L.) is one of the most important staple food crops in the world, with over varieties are grown under diverse geographical conditions. Today, it is crucial to develop wheat varieties that have tolerance to various biotic factors and abiotic stress conditions, particularly those arising from climate change. *In vitro* androgenesis and somatic embryogenesis techniques are among the most significant biotechnological methods that accelerate wheat breeding and cultivation.

The research basically consists of two main areas; androgenesis and somatic embryogenesis studies. These studies aimed to develop improved protocols for the production of high numbers of haploid/doubled haploid plants by androgenesis (using microspore and anther culture) and to establish high-efficiency somatic embryogenesis protocols using scutellum and leaf explants in various spring and winter wheat varieties, including bread wheat (*T. aestivum* L.) and durum wheat (*T. turgidum* Desf.). In order to establish these protocols, we investigated the effects of several key factors (genotype, explant, induction and regeneration media) on microspore embryogenesis and somatic embryogenesis processes focusing on embryoid/embryo and shoot/plant formation.

Androgenesis experiments were conducted in three groups, using Altındane, Dariel, Pehlivan, Ceyhan-99, Sagittario, Bayraktar and Esperia bread wheat varieties, as well as Svevo, Sarıçanak, Eminbey and Kiziltan durum wheat varieties as plant materials. In group I, II and III experiments, 5, 18 and 8 different induction media, respectively, were tested in anther and microspore cultures containing microspores of some of the above genotypes in the middle to late single-nucleate stage. Additionally somatic embryogenesis studies conducted in four groups using the Ceyhan-99, Sagittario, Svevo and Sarıçanak genotypes in I, II, III and IV. group experiments. Each genotype's scutellum and leaf explants were cultured in 9 different induction media. These induction

media were prepared by adding different types and concentrations of plant growth regulators, glutamine, and arabinogalactan to different basic nutrient media, with maltose or sucrose as carbohydrate source. The structures formed in the induction media were cultured in different regeneration media to be transformed into plants.

The results of the androgenesis trial in this thesis highlighted the significance of genotype and induction medium factors in androgenic responses, including the induction and regeneration of embryoids, as well as the production of albino and green plant in wheat. Overall, the study found that more embryoids were obtained from microspore culture compared to anther culture.

In the somatic embryogenesis trial results, bread wheat genotypes showed superior performance than durum wheat genotypes across all examined parameters of somatic embryogenesis. Regarding of explant source, scutellum explants showed higher response than leaf explants in total callus production, embryogenic callus production, callus size, green spot formation, shoot per callus and regenerated plant per callus. However leaf explants produced heavier calli, which may be potentially useful for *in vitro* secondary metabolite production.

KEYWORDS: Androgenesis, Arabinogalactan, Somatic embryogenesis, Regeneration, *Triticum aestivum* L., *Triticum durum* Desf.

COMMITTEE: Prof. Dr. Esin ARI

Prof. Dr. Nedim MUTLU

Prof. Dr. Taner AKAR

Prof.Dr. Serpil TANGOLAR

Prof.Dr. Kamil HALILOĞLU

ÖNSÖZ

Buğday (*Triticum aestivum* L.), bir milyardan fazla insanın temel gıda maddesi olup, farklı coğrafi koşullarda 17.000'den fazla çeşidi ile yetiştirilmektedir. Bu çeşitler arasında ekmeklik buğday (*T. aestivum* L.) çeşitlerinin yanı sıra makarnalık buğday (*T. turgidum* Desf.) çeşitleri de önem taşımakta ve küresel buğday üretiminin %7'sini temsil etmektedir. 2022 yılında küresel buğday üretimi %2.2 azalarak 785.1 milyon ton olmuştur. 2023 yılında üretimde %11.4 artış olmasına rağmen, Türkiye'de kuraklık endişesi yaşanmaktadır. Bu nedenle çevresel ve biyolojik zorluklara uyum sağlayabilen buğday çeşitlerinin geliştirilmesi hayati önem taşımaktadır. Androgenesis ve somatik embriyogenesis gibi bitki ıslah yöntemleri, buğday ıslahını hızlandırmak ve genetik transformasyon teknikleriyle mahsul dayanıklılığını ve verimini artırmak için son derece önemlidir.

Tezimin planlanmasından tamamlanmasına kadar bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren, her türlü imkanı sağlayan ve sorularımı büyük bir sabır ve özveriyle yanıtlayan değerli danışman hocam Prof. Dr. Esin ARI'ya saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez jürimde yer alarak değerli yorum ve tavsiyelerini paylaşan Prof. Dr. Nedim MUTLU ve Prof. Dr. Taner AKAR hocalarıma teşekkür ederim. Ayrıca, Prof. Dr. Taner AKAR hocaya tohum teminindeki yardımı için gönülden teşekkür ederim. Prof. Dr. Faik KANTAR hocama, bitki yetiştiriciliği sırasında iklim odası koşullarını sağladığı için minnettarım.

Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığı'na (YTB) ve Türkiye Bursları'na bana doktora yapmam için çok değerli bir fırsat sundukları için en samimi teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, tezimin Türkçe dilbilgisi ve yapısının düzeltilmesine yönelik değerli yardımları için laboratuvar arkadaşım Ahmet İZMİRLİ'ye en içten teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimime başlamamda beni teşvik eden, her türlü fedakarlığı gösteren ve bana olan inancını daima hissettiren sevgili eşim Shafıqa SHARAFAT'a da teşekkür etmek istiyorum. Ailemize ve çocuklarımıza tek başına baktığı için ona minnettarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
AKADEMİK BEYAN	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK TARAMASI.....	7
2.1. Buğdayda Haploidizasyon - Androgenesis Çalışmaları.....	7
2.1.1. Buğdayda Anter Kültürü Çalışmaları.....	8
2.1.2. Buğdayda Mikrospor Kültür Çalışmaları.....	15
2.1.3. Buğdayda Shed-Mikrospor Kültürü Çalışmaları	22
2.2. Buğdayda Somatik Embriyogenesis Çalışmaları	24
3. MATERYAL VE METOT	32
3.1. Androgenesis çalışmaları	32
3.1.1. Materyal	32
3.1.1.1. Bitki Materyali	32
3.1.1.2. Androgenesis Çalışmalarında Kullanılan Besin Ortamları ve Kimyasal Maddeler.....	34
3.1.2. Metot	40
3.1.2.1. Androgenesis çalışmaları için mikrosporların uygun gelişim aşamalarının belirlenmesi	40
3.1.2.2. Ön Muamele.....	41
3.1.2.3. Yüzey Sterilizasyonu	41
3.1.2.4. Anter kültürleri.....	42
3.1.2.5. Mikrospor kültürleri	43
3.1.2.6. Bitki rejenerasyonu ve aklimatizasyon	45
3.1.2.7. Araştırma tasarımı ve veri analizi	46
3.2. Somatik embriyogenesis çalışmaları.....	49
3.2.1. Materyal	49

3.2.1.1.	Bitki materyali.....	49
3.2.1.2.	Somatik embriyogenesis çalışmalarında kullanılan besin ortamları ve kimyasal maddeler	49
3.2.2.	Metot	52
3.2.2.1.	Yüzey Dezenfeksiyon	52
3.2.2.2.	Eksplantların izolasyonu ve kültürü.....	53
3.2.2.3.	Kallus kültürleri, rejenerasyon ve aklimatizasyon	55
3.2.2.4.	Araştırma tasarımı ve veri analizi	55
4.	BULGULAR VE TARTIŞMA.....	58
4.1.	Androgenesis çalışmaları bulguları.....	58
4.1.1.	I. Grup androgenesis çalışmaları (anter kültürleri) bulguları.....	58
4.1.2.	II. Grup androgenesis çalışmaları bulguları	59
4.1.2.1.	II. Grup androgenesis çalışmalarındaki anter kültürleri bulguları ..	59
4.1.2.2.	II. Grup androgenesis çalışmalarındaki mikrospor kültürleri bulguları	63
4.1.3.	III. Grup androgenesis çalışmaları bulguları.....	70
4.1.3.1.	III. Grup androgenesis çalışmalarındaki anter kültürleri bulguları .	70
4.1.3.2.	III. Grup androgenesis çalışmalarındaki mikrospor kültürleri bulguları.....	72
4.2.	Somatik embriyogenesis çalışmaları bulguları	80
4.2.1.	I. Grup somatik embriyogenesis deneme bulguları.....	80
4.2.1.1.	Genotip, eksplant ve indüksiyon ortamı faktörlerinin toplam kallus oluşumu, embriyogenik kallus oranı, kallus boyutu ve kallus ağırlığı üzerine etkileri.....	80
4.2.1.2.	Genotip, eksplant ve rejenerasyon ortamı faktörlerinin yeşil nokta oluşumu, rejenerant bitki oranı ve kallus başına sürgün sayısı üzerine etkileri	87
4.2.2.	II. Grup somatik embriyogenesis deneme bulguları	92
4.2.2.1.	Genotip, eksplant ve indüksiyon ortamı faktörlerinin toplam kallus oluşumu, embriyogenik kallus oranı, kallus boyutu ve kallus ağırlığı üzerine etkileri	92
4.2.2.2.	Genotip, eksplant ve indüksiyon ortamı faktörlerinin yeşil	

nokta oluşumu, rejenerant bitki oranı ve kallus başına sürgün sayısı üzerine etkileri	98
4.2.3. III. Grup somatik embriyogenesis deneme bulguları	101
4.2.3.1. Genotip, eksplant ve indüksiyon ortamı faktörlerinin toplam kallus oluşumu, embriyojenik kallus oranı, kallus boyutu ve kallus ağırlığı üzerine etkileri	101
4.2.3.2. Genotip, eksplant ve indüksiyon ortamı faktörlerinin yeşil nokta oluşumu, rejenerant bitki oranı ve kallus başına sürgün sayısı üzerine etkileri	107
4.2.4. IV. Grup somatik embriyogenesis deneme bulguları	111
4.2.4.1. Genotip, eksplant ve indüksiyon ortamı faktörlerinin toplam kallus oluşumu, embriyojenik kallus oranı, kallus boyutu ve kallus ağırlığı üzerine etkileri	111
4.2.4.2. Genotip, eksplant ve indüksiyon ortamı faktörlerinin yeşil nokta oluşumu, rejenerant bitki oranı ve kallus başına sürgün sayısı üzerine etkileri	118
4.2.5. Somatik embriyogenesis çalışmalarında karbonhidrat kaynaklarının kallus üretimi ve embriyojenik kallus oluşumu üzerine etkisi	121
4.3. TARTIŞMA	125
5. SONUÇLAR.....	139
6. KAYNAKLAR.....	142
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Doktora Tezi olarak sunduğum “Buğdayda (*Triticum aestivum* L.) *In Vitro* Androgenesis ve Somatik Embriyogenesis” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

31/07/2024

Ahmad Ratib SHARAFAT

İmzası

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
μM	: Mikromolar
mm	: Milimetre
cm	: Santimetre
μL	: Mikrolitre
mL	: Mililitre
L	: Litre
mg	: Miligram
mg/L	: Miligram/Litre
< / >	: Büyükten / Küçükten
***	: Önemli ölçüde
ÖD	: Önemli Değil

Kısaltmalar

AG	: Arabinogalaktan
BAP	:Benzil amino purin
BGD	:Bitki gelişim düzenleyicisi
CHB	: Chu vd.(1990) besin ortamı
CRISPR	:Düzenli aralıklarla tekrarlanmış kısa palandromik tekrarlar
DAPI	: 4',6-Diamidino-2-phenylindole
ELS	:Embriyo benzer yapılar
FAO	:Food and Agriculture Organization
MS	:Murashige ve Skoog (1962) besin ortamı

NAA	:Naftalin asetik asit
NN	:Nitsch ve Nitsch (1969) besin ortamı
2,4-D	:2,4-diklorofenoksi asetik asit



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Buğday bitkisinde haploid bitki elde etme yöntemleri.....	2
Şekil 1.2. Buğday bitkisinde somatik embriyogenesis elde edilmesi	4
Şekil 3.1. Akdeniz Üniversitesinde sera koşullarda bitki yetiştiriciliği.....	33
Şekil 3.2. Akdeniz Üniversitesi kontrol ve çiftlik sera koşullarında bitki yetiştiriciliği.	34
Şekil 3.3. Androgenesis çalışmaları için mikrosporların uygun gelişim aşamaları	40
Şekil 3.4. Uygun aşamadaki mikrospora sahip başakların ön muamele için hazırlanması	41
Şekil 3.5. Başakların yüzey dezenfeksiyon aşamaları	42
Şekil 3.6. Anter kültürlerinin mikroskop gözlemlerinden bazı görüntüler	42
Şekil 3.7. Mikrospor kültürlerinde mikrosporların izolasyon ve yoğunluk belirleme aşamaları	44
Şekil 3.8. Mikrospor kültürlerinin mikroskop gözlemlerinden bazı görüntüler	45
Şekil 3.9. Somatik embriyogenesis için eksplantların izolasyonu ve kültürü	54
Şekil 4.1. I. grup androgenesis çalışmaları kapsamında yapılan anter kültürlerinde gözlemlenen bazı rejenerasyon oluşumları: (a) indüksiyon ortamında embriyoid üretimi (b) yeşil ve albino bitkilerin rejenerasyonu (c) yeşil rejenere bitkiciklerin gelişimi.....	59
Şekil 4.2. II. grup androgenesis çalışmaları kapsamında yapılan anter kültürlerinde gözlemlenen bazı rejenerasyon oluşumları: (a, b) indüksiyon ortamlarında embriyoid oluşumları, (c, d) anter kültürlerinden oluşan albino bitkicikler ..	62
Şekil 4.3. Erken evrede mikroskopta yapılan gözlemlerde rastlanan mikrosporların bölünme sayılarına göre gelişimleri; (a) 2 bölünmeli mikrospor, (b) 3 bölünmeli mikrospor (c) 4 bölünmeli mikrosporlar.....	65
Şekil 4.4. II. grup androgenesis çalışmaları kapsamında yapılan mikrospor kültürlerindeki embriyo gelişimleri; (a) İndüksiyon ortamında oluşan embriyolar, (b) rejenerasyon ortamına aktarılan embriyolar.	69
Şekil 4.5. III. grup androgenesis çalışmaları kapsamında yapılan anter kültürlerinde gözlemlenen bazı rejenerasyon oluşumları; (a) anter kültürlerinden elde edilen embriyoidler, (b) anter kültürlerinden elde edilen bir albino bitki.....	71
Şekil 4.6. (a) Mikrospor kültürlerinden elde edilen embriyoidler, (b) mikrospor kültürlerinden elde edilen albino bitki, (c, d) Mikrospor kültürlerinden elde	

edilen yeşil sürgünler	79
Şekil 4.7. I. grup somatik embriyogenesis denemelerinde; (a) skutellum eksplantından elde edilen embriyojenik kallus, (b) yaprak eksplantından elde edilen embriyojenik kallus.....	82
Şekil 4.8. I. grup somatik embriyogenesis denemelerinde; (a) skutellum eksplantından elde edilen yeşil noktalar, (b) yaprak eksplantından elde edilen yeşil noktalar.....	90
Şekil 4.9. I. Grup somatik embriyogenesis denemelerinde kalluslardan oluşan sürgünler.....	91
Şekil 4.10. I. grup somatik embriyogenesis denemelerinde; (a) embriyojenik kallustan rejenerasyonu, (b, c) kök geliştirme ortamında gelişen rejenerant bitkicik, (d) bitkiciklerin toprağa aktarılması, (e) somatik embriyogenesisten oluşan fertil bitki.	91
Şekil 4.11. III. Grup somatik embriyogenesis denemelerinde; (a) skutellum eksplantından oluşan kallus boyutu, (b) yaprak eksplantından oluşan kallus boyutu.....	106
Şekil 4.12. III. Grup somatik embriyogenesis denemelerinde; (a) gelişmiş yeşil noktalar, (b) yeşil noktalardan sürgün oluşumu, (c) rejenere bitkiciklerin gelişimi, (d,e) aklimatizasyonu yapılan bitkicikler	110

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan buğday genotipleri.	32
Çizelge 3.2. I. grup androgenesis çalışmalarındaki anter kültürlerinde kullanılan indüksiyon ortamları	34
Çizelge 3.3. Androgenesis çalışmalarında kullanılan indüksiyon ve rejenerasyon kültür ortamlarının içerikleri (mg/L).....	35
Çizelge 3.4. II. ve III. grup androgenesis çalışmalarının mikrospor kültürlerinde izolasyon ortamı olarak kullanılan FHG ortamı makro elementleri bileşenleri.....	36
Çizelge 3.5. II. grup androgenesis çalışmalarının anter ve mikrospor kültürlerinde kullanılan indüksiyon ortamlarının içerikleri.....	37
Çizelge 3.6. III. grup androgenesis çalışmalarının anter ve mikrospor kültürlerinde kullanılan indüksiyon ortamlarının içerikleri.....	38
Çizelge 3.7. Androgenesis çalışmalarında kullanılan kimyasalların stok çözelti bilgileri	39
Çizelge 3.8. I. grup androgenesis çalışmalarındaki anter kültürü denemelerine ait deneme bilgileri.....	46
Çizelge 3.9. II. grup androgenesis çalışmalarındaki anter ve mikrospor kültürü denemelerine ait deneme bilgileri	47
Çizelge 3.10. III. grup androgenesis çalışmalarındaki anter ve mikrospor kültürü denemelerine ait deneme bilgileri	48
Çizelge 3.11. Somatik embriyogenesis çalışmalarındaki 4 ana indüksiyon ortam deneme grubunun temel besin ortamları, karbonhidrat kaynakları ve diğer temel özellikleri (mg/L)	49
Çizelge 3.12. Somatik embriyogenesis çalışmalarında kullanılan indüksiyon ortamlarının temel besin ortamları ve rejenerasyon ortamlarının içerikleri (mg/L)	50
Çizelge 3.13. I. grup, II. grup, III. grup ve IV. grup somatik embriyogenesis denemelerinin her birisindeki 9'ar indüksiyon ortamının içerikleri	52
Çizelge 3.14. Somatik embriyogenesis çalışmalarındaki 4 ana indüksiyon ortamı deneme grubunun her bir grubunda kurulan ortam denemelerine ait deneme bilgileri.....	56
Çizelge 3.15. Somatik embriyogenesis çalışmalarındaki 2 ana rejenesiyon ortamı deneme grubunun her bir grubunda kurulan ortam denemelerine ait deneme bilgileri.....	57
Çizelge 4.1. I. grup androgenesis çalışmalarında (anter kültürlerinde) her 100 anter başına elde edilen ortalama embriyoid, albino bitki ve yeşil bitki sayıları	58
Çizelge 4.2. II. grup androgenesis çalışmalarının anter kültürlerinde genotiplerin ve ortamların embriyo ve bitki üretme üzerindeki etkileri.....	60
Çizelge 4.3. II. grup androgenesis çalışmalarının mikrospor kültürlerinde genotiplerin	

ve ortamların mikrospor bölünmesi ve embriyoid verimi üzerine etkileri .63	
Çizelge 4.4. II. grup androgenesis çalışmalarının mikrospor kültürlerinde genotip x ortam interaksiyonunun mikrospor bölünmesi (%) üzerine etkileri	65
Çizelge 4.5. II. grup androgenesis çalışmalarının mikrospor kültürlerinde genotip x ortam interaksiyonunun 2 bölünmeli mikrospor gelişimi üzerine etkileri ..	66
Çizelge 4.6. II. grup androgenesis çalışmalarının mikrospor kültürlerinde genotip x ortam interaksiyonunun 3 bölünmeli mikrospor gelişimi üzerine etkileri ..	67
Çizelge 4.7. II. grup androgenesis çalışmalarının mikrospor kültürlerinde genotip x ortam interaksiyonunun 4 bölünmeli mikrospor gelişimi üzerine etkileri	68
Çizelge 4.8. III. grup androgenesis çalışmalarının anter kültürlerinde genotip ve indüksiyon ortamlarının embriyoid ve albino bitki oluşumu üzerine etkileri.	70
Çizelge 4.9. III. grup androgenesis çalışmalarının anter kültürlerinde genotip x ortam interaksiyonunun embriyo ve albino bitki oluşumu üzerindeki etkisi.	72
Çizelge 4.10. III. grup androgenesis çalışmalarının mikrospor kültürlerinde genotip ve ortamların mikrospor bölünmesi, embriyoid ve albino bitki verimi üzerine etkileri.....	73
Çizelge 4.11. III. grup androgenesis çalışmalarının mikrospor kültürlerinde genotip x ortam interaksiyonunun mikrospor bölünmesi üzerine etkileri	74
Çizelge 4.12. III. grup androgenesis çalışmalarının mikrospor kültürlerinde genotip x ortam interaksiyonunun 2, 3 ve 4 bölünmeli mikrospor gelişimleri üzerine etkileri.....	77
Çizelge 4.13. III. grup androgenesis çalışmalarının mikrospor kültürlerinde genotip x ortam interaksiyonunun embriyoid ve albino bitki oluşumu üzerine etkisi*	78
Çizelge 4.14. I. Grup somatik embriyogenesis denemelerinde genotip, eksplant ve indüksiyon ortamının toplam kallus oluşumu, embriyojenik kallus oranı, kallus boyutu ve kallus ağırlığı üzerindeki etkileri.....	81
Çizelge 4.15. I. Grup somatik embriyogenesis denemelerinde eksplant x genotip x indüksiyon ortamı interaksiyonunun toplam kallus oluşumu (%) üzerine etkileri.....	84
Çizelge 4.16. I. grup somatik embriyogenesis denemelerinde eksplant x genotip x indüksiyon ortamı interaksiyonunun embriyojenik kallus oluşumu üzerine etkileri.....	85
Çizelge 4.17. I. grup somatik embriyogenesis denemelerinde eksplant x genotip x indüksiyon ortamı interaksiyonunun kallus boyutu (mm/eksplant) üzerine etkileri.....	86
Çizelge 4.18. I. Grup somatik embriyogenesis denemelerinde eksplant x genotip x indüksiyon ortamı interaksiyonunun kallus ağırlığı (mg/eksplant) üzerine etkileri.....	87
Çizelge 4.19. I.grup somatik embriyogenesis denemelerinde genotip, eksplant ve rejenerasyon ortamının yeşil nokta sayısı, kallus başına sürgün sayısı ve rejenerant bitki.....	88

Çizelge 4.20. I.grup somatik embriyogenesis denemelerinde genotip x eksplant x rejenerasyon ortamı interaksiyonunun yeşil nokta, kallus başına sürgün ve rejenerant bitki üzerine etkileri.....	89
Çizelge 4.21. II. Grup somatik embriyogenesis denemelerinde genotip, eksplant ve indüksiyon ortamının toplam kallus oluşumu, embriyojenik kallus oranı, kallus boyutu ve kallus ağırlığı üzerindeki etkileri.....	93
Çizelge 4.22. II. Grup somatik embriyogenesis denemelerinde eksplant x genotip x indüksiyon ortamı interaksiyonunun toplam kallus oluşumu üzerine etkileri	95
Çizelge 4.23. II. Grup somatik embriyogenesis denemelerinde eksplant x genotip x indüksiyon ortamı interaksiyonunun embriyojenik kallus oluşumu üzerine etkileri.....	96
Çizelge 4.24. II. Grup somatik embriyogenesis denemelerinde eksplant x genotip x indüksiyon ortamı interaksiyonunun kallus boyutu üzerine etkileri	97
Çizelge 4.25. II. Grup somatik embriyogenesis denemelerinde eksplant x genotip x indüksiyon ortamı interaksiyonunun kallus ağırlığı üzerine etkileri.....	97
Çizelge 4.26. II. grup somatik embriyogenesis denemelerinde genotip, eksplant ve rejenerasyon ortamının yeşil nokta sayısı, kallus başına sürgün sayısı ve rejenerant bitki sayısı üzerine etkileri	99
Çizelge 4.27. II. grup somatik embriyogenesis denemelerinde genotip x eksplant x rejenerasyon ortamı interaksiyonunun yeşil nokta, kallus başına sürgün ve rejenerant bitki üzerine etkileri.....	100
Çizelge 4.28. III. Grup somatik embriyogenesis denemelerinde genotip, eksplant ve indüksiyon ortamının toplam kallus oluşumu, embriyojenik kallus oranı, kallus boyutu ve kallus ağırlığı üzerindeki etkileri.....	102
Çizelge 4.29. III. Grup somatik embriyogenesis denemelerinde eksplant x genotip x indüksiyon ortamı interaksiyonunun toplam kallus oluşumu üzerine etkileri	103
Çizelge 4.30. III. Grup somatik embriyogenesis denemelerinde eksplant x genotip x indüksiyon ortamı interaksiyonunun embriyojenik kallus oluşumu üzerine etkileri.....	104
Çizelge 4.31. III. Grup somatik embriyogenesis denemelerinde eksplant x genotip x indüksiyon ortamı interaksiyonunun kallus boyutu üzerine etkileri	105
Çizelge 4.32. III. Grup somatik embriyogenesis denemelerinde eksplant x genotip x indüksiyon ortamı interaksiyonunun kallus ağırlığı üzerine etkileri.....	107
Çizelge 4.33. III.grup somatik embriyogenesis denemelerinde genotip, eksplant ve rejenerasyon ortamının yeşil nokta sayısı, kallus başına sürgün sayısı ve rejenerant bitki.....	109
Çizelge 4.34. III.grup somatik embriyogenesis denemelerinde genotip x eksplant x rejenerasyon ortamı interaksiyonunun yeşil nokta, kallus başına sürgün ve rejenerant bitki üzerine etkileri.....	111
Çizelge 4.35. IV. Grup somatik embriyogenesis denemelerinde genotip, eksplant ve	

indüksiyon ortamının toplam kallus oluşumu, embriyojenik kallus oranı, kallus boyutu ve kallus ağırlığı üzerindeki etkileri.....	112
Çizelge 4.36. IV. Grup somatik embriyogenesis denemelerinde eksplant x genotip x indüksiyon ortamı interaksyonunun toplam kallus oluşumu üzerine etkileri	113
Çizelge 4.37. IV. Grup somatik embriyogenesis denemelerinde eksplant x genotip x indüksiyon ortamı interaksyonunun embriyojenik kallus oluşumu üzerine etkileri.....	115
Çizelge 4.38. IV. grup somatik embriyogenesis denemelerinde eksplant x genotip x indüksiyon ortamı interaksyonunun kallus ağırlığı (mg/kallus) üzerine etkileri	118
Çizelge 4.39. IV. Grup somatik embriyogenesis denemelerinde genotip, eksplant ve rejenerasyon ortamının yeşil nokta sayısı, kallus başına sürgün sayısı ve rejenerant bitki sayısı üzerine etkileri	119
Çizelge 4.40. IV. Grup somatik embriyogenesis denemelerinde genotip x eksplant x rejenerasyon ortamı interaksyonunun yeşil nokta, kallus başına sürgün ve rejenerant bitki üzerine etkileri.....	120
Çizelge 4.41. Somatik embriyogenesis denemelerindeki ortamlara eklenen karbonhidrat kaynaklarının kallus üretimi ve embriyojenik kallus oluşumu üzerine etkisi	121
Çizelge 4.42. Somatik embriyogenesis denemelerinde karbonhidrat kaynağı x eksplant interaksyonunun kallus üretimi ve embriyojenik kallus oluşumu üzerine etkileri.....	122
Çizelge 4.43. Somatik embriyogenesis denemelerinde karbonhidrat kaynağı x genotip interaksyonunun kallus üretimi ve embriyojenik kallus oluşumu üzerine etkileri.....	123
Çizelge 4.44. Somatik embriyogenesis denemelerinde karbonhidrat kaynağı x eksplant x genotip interaksyonunun kallus üretimi ve embriyojenik kallus oluşumu üzerine etkileri	124

1. GİRİŞ

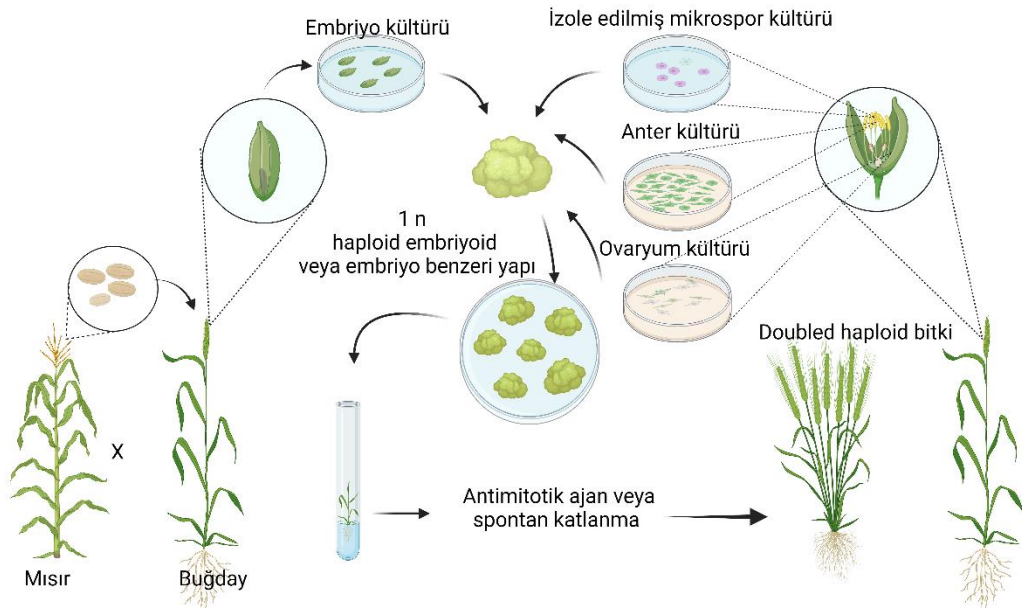
Bir milyardan fazla kişinin ana besin maddesi olan buğday (*Triticum aestivum* L.), farklı coğrafi koşullarda yetişmektedir. Bununla birlikte, her biri belirli bölgelere uygun hale getirilmiş 17.000'den fazla farklı buğday çeşidi bulunmaktadır (Snustad ve Simmons. 2015). Bu çeşitler arasında makarnalık buğday (*Triticum turgidum* Desf.); makarna, bulgur, kuskusve bazı ekmeklerde önde gelen mahsul olarak öne çıkmakta, bu nedenle dünya buğday üretiminin yaklaşık %7'sini temsil etmektedir (Levy ve Feldman. 2022). Dünya buğday üretimi 2022 yılında bir önceki yıla göre yaklaşık %2.2 (18 milyon ton) düşüş göstererek yaklaşık 785.1 milyon ton olarak gerçekleşmiştir (FAO 2023). 2022-2023 döneminde Türkiye tahıl ürünleri ihtiyacının büyük bir kısmı (%92.3) yerli üretimle karşılanmıştır. Toplam tahıl üretiminin en önemli kalemini oluşturan buğday, %95.9'luk bir kendi kendine yeterlilik oranına ulaşmıştır. Bu oran makarna ve bulgur gibi ürünlerde kullanılan makarnalık buğdayında %181 iken, diğer buğday çeşitlerinde %86.4 olarak gerçekleşmiştir. Toplam 22 milyon ton üretimiyle dünyanın en önemli buğday üreticilerinden olan Türkiye dünyada üretim açısından 11. sırada olup (USDA 2024), 2022 yılına kıyasla 2023 yılında % 11.4 oranında artış göstermesine rağmen(TSI 2023), ana kışlık buğday üretim bölgesi olan Anadolu Platosu'nda yaygın kuraklık endişeleri hâlâ devam etmektedir (FAOSTAT 2023). Bu nedenle, çeşitli çevresel ve biyolojik zorluklara uyum sağlayabilen buğday çeşitlerinin acil olarak geliştirilmesi gerekmektedir. Bunun yanı sıra, 21. yüzyılda insanlığın gıda güvenliğine yönelik karşı karşıya olduğu en büyük tehdit, inanılmaz derecede öngörülemeyen iklim değişikliğidir (Ishaque vd. 2023). Dünya sıcaklığında 1 °C artışla, küresel buğday verimi $\%6 \pm 2.9$ oranında azalacağı öngörülmektedir (Zhao vd. 2017). Daha besleyici, dayanıklı ve verimli buğday çeşitlerinin geliştirilmesi, üretimi önemli ölçüde artırmak için kritik öneme sahiptir. Farklı yöntemler uygulanarak ıslah sürecini hızlandırabilir ve ıslah programlarının etkinliği artırılabilir.

Son zamanlarda ıslahı hızlandırmak için başvuru yöntemlerin başında haploid indüksiyon prosedürü gelmektedir. Bitki tür ve hatta çeşitlerine özel etkili bir indüksiyon protokolü, doubled haploid (DH) teknolojisinin başarılı bir şekilde uygulanabilmesi için hayati öneme sahiptir ve ticari çeşitlerin geliştirilmesini kolaylaştırır (Slama-Ayed vd. 2019). Modern bitki ıslahında, DH bitki üretim tekniği, ıslahı hızlandırıcı bir biyoteknolojik yöntemdir. Bu teknik, pratik araştırmalarda ıslah sürecini önemli ölçüde

hızlandırmak için kullanıldığı gibi, aynı zamanda verim artırma ve hastalık direnci gibi alanlardaki temel araştırmalarda da büyük öneme sahiptir (Satpathy vd. 2021).

Haploid (n) hücreler, spontan veya yapay indüksiyon yoluyla kromozomlarının iki katına çıkması sonucunda DH olarak bilinen bir genotip oluştururlar (Vural vd. 2019). İlk başarılı haploid bitkilerin elde edilmesi 1973 yılında *Datura innoxia*'da yapılmış ve bu ilerleme Nitsch ve Noreel'in çalışmaları ile devam etmiştir (Nitsch 1973). Son 10 yılda, buğday haploidi çalışmalarında önemli ilerlemeler kaydedilmiş ve buğdayda yüksek miktarda haploid bitki üretmek için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir.

Buğday bitkilerini hızlıca ıslah etmek için genellikle androgenesis adı verilen bitkinin erkek üreme hücrelerinin kullanılarak haploid embriyoların uyartıldığı (mikrospor embriyogenesi) yöntemle haploid/DH bitkiler üretilir. Bu yöntemde anter kültürü (Zhih-ching vd. 1973) veya mikrospor (olgunlaşmamış polen hücreleri) (Mejza vd. 1993) kültürü kullanılarak DH bitkiler elde edilir. Androgenesis dışında, gynogenesis (Sibi vd. 2001) ve türler arası melezlemeler sonrası embriyo kurtarma yoluyla (Barclay 1975) da DH bitkiler elde edilebilir (Şekil 1.1). Gynogenesisde, tozlaşmamış yumurtalıkların kültürü yoluyla haploid bitki gelişimi indüklenir. Türler arası melezlemede ise, istenen özelliklere sahip aynı cinsten bir tozlayıcı veya genetik olarak uzak bir erkek partnerle tozlaşma yapılır ve ardından embriyo kurtarma gerçekleştirilir (Slama-Ayed vd. 2019).



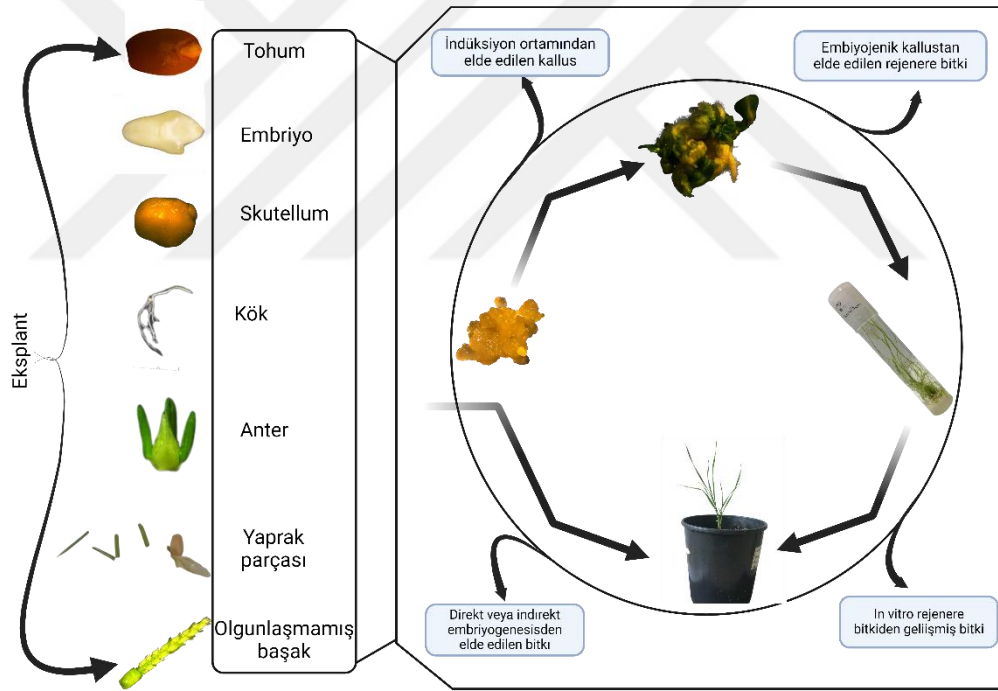
Şekil 1.1. Buğday bitkisinde haploid bitki elde etme yöntemleri (Orijinal: A.R.Sharafat)

DH teknolojisi; resesif alelleri hızlı bir şekilde tanımlama (Kanbar vd. 2020a) seçilen hatların tam homozigotluğa doğru ilerlemesini hızlandırma ve seleksiyon verimliliğini artırma gibi imkanlar sunar (Zhang vd. 1996). Ayrıca, DH yöntemler indüklenmiş mutagenesis ve genetik transformasyon üzerine araştırmalar için de bir araç sağlar (Eliby vd. 2022). Bu teknolojilerin kullanılması, önemli embriyogenik potansiyele sahip bir hücre kültür sisteminin kurulmasına bağlıdır (Kopertekh ve Stribnaya. 2003). Bu hücre kültür sistemleri haploid hücre kültürü olabileceği gibi somatik hücre kültürü de olabilir. Somatik embriyogenesis sisteminde; doğrudan veya kallus dokusu oluşturma yoluyla bitkilerin somatik hücrelerinden somatik embriyoların indüklenmesi gerçekleştirilebilir (Kopertekh ve Stribnaya. 2003). Burada somatik hücreler, hücre bölünmesinin karmaşık bir süreciyle embriyoları oluşturmak için uyarılır ve sonunda tam bitkilere dönüşerek totipotensi fenomenini gösterir (Mujib ve Šamaj. 2006). İlk başarılı somatik bitki elde etme işlemi ilk kez 1958'de havuçta (*Daucus carota*) Steward vd. tarafından gerçekleştirilmiştir.

Kültüre alınan eksplant tipi, bitki gelişim düzenleyicileri (BGD), kültür koşulları gibi çeşitli faktörler somatik embriyogenesisin başarısında kritik role sahiptir Kahriz ve Kahriz. 2017). Bu süreçte kullanılan çeşitli eksplantlar arasında; olgun embriyo (Aadel vd. 2016; Filippov vd. 2006; Ekom vd. 2013), olgun embriyo parçaları (Delporte vd. 2001), olgunlaşmamış embriyo (le Roux vd. 2016), olgun skutella (Yadav vd. 2020), olgunlaşmamış skutellum (He ve Lazzeri. 2001; Yadav vd. 2020), olgunlaşmamış infloresans (He ve Lazzeri. 2001; Kavas vd. 2008) ve yaprak segmentleri (Chugh ve Khurana. 2003; Kopertekh ve Stribnaya. 2003; Yu vd. 2012). Belirtilen eksplantlar arasında, olgunlaşmamış embriyonun rejenerasyon için en etkili eksplant olduğu tespit edilmiştir (le Roux vd. 2016; Parmar vd. 2012). Ne yazık ki, bu eksplantlardan elde edilecek başarı genotipe bağlıdır (Zhang vd. 2015) ve sadece anthesisten 4- 14 gün sonra kısa bir süre için mevcuttur (Filippov vd. 2006). Somatik embriyolardan bitkiciklerin başarılı bir şekilde rejenerasyonu bitkilerin geliştirilmesi için temel bir gerekliliktir (Takumi ve Shimada. 1997).

Buğday bitkisinin androgenesis ve somatik embriyogenesis çalışmalarında, araştırmacılar haploid üretimi ve somatik hücrelerden bitki rejenerasyonu amacıyla çeşitli kimyasal bileşiklerden yararlanmışlardır. Bu çalışmalar kapsamında, iyonik sıvı (Weigt vd. 2020), zearalenone(Weigt vd. 2019), n-bütanol (Broughton 2011), DMSO (Echávarri

ve Cistué. 2016; Sharafat vd. 2023), Trichostatin A (Castillo vd. 2020; Jiang vd. 2017; Wang vd. 2019), antimikrotübül herbisitler (Hansen ve Andersen. 1998), 2-hidroksinikotinik asit (Zheng vd. 2001), sefotaksim (Asif vd. 2013), antioksidan (Asif, Eudes, Goyal, vd., 2013), Fitosulfokin alfa (Asif vd. 2014) ve anti-apoptotik rekombinant insan B-hücre lenfoma-2 (Bcl-2 Δ 21) ve kaspaz-3-inhibitörü (Ac-DEVD-CHO) (Sinha vd. 2016) gibi bileşikler androgenesis çalışmalarında kullanılmıştır. Ayrıca, birçok araştırmacı duyarlı buğday genotiplerinde androgenesis yoluyla canlı yeşil bitkilerin üretim verimliliğini artırmaya yönelik kapsamlı çalışmalar yürütmüştür. Ancak, umut verici sonuçlara rağmen buğdayda androgenesis hala genotip bağımlılığı, albinizm oluşumu ve sağlıklı yeşil bitki üretiminde yetersiz etkinlik gibi zorluklarla karşı karşıyadır.



Şekil 1.2. Buğday bitkisinde somatik embriyogenesis elde edilmesi (Orijinal: A.R.Sharafat)

Buğday bitkisinin somatik embriyogenesisine yönelik birçok araştırma yapılmıştır ve bu araştırmalarda arabinogalaktan proteinleri ve hidrojen peroksit gibi çeşitli kimyasal maddeler embriyjenik kallus uyartımı için kullanılmıştır (Zhang vd. 2015). Ayrıca,

poliaminler (Aydin vd. 2016), antibiyotikler (Bannikova vd. 2016), Trichostatin A (Bie vd. 2020), bitki hormonları ve karbon kaynakları gibi maddeler de kullanılmıştır (Filippov vd. 2006; Sanjay Singh Parmar vd. 2012; Yadav vd. 2020). Tüm bu çalışmalar, kültür ortamının geliştirilmesine katkıda bulunmuş ve zaten ortalamanın üzerinde rejenerasyon potansiyeline sahip çeşitlerin rejenerasyon oranını önemli ölçüde artırmıştır. Ancak ortam geliştirmesine rağmen, doğal olarak düşük rejenerasyon oranlarına sahip çeşitlerde, rejenerasyon da nadiren gözlenmektedir (Zhang vd. 2015).

Androgenesis ve somatik embriyogenesis teknikleri, heksaploid (BBAADD) buğdaydaki 17.000 Mbp'lik geniş genomları hem de tetraploid (AABB) buğdaydaki 12.000 Mbp'lik genomları nedeniyle önemli zorluklar sunmaktadır. Her ikisi de Poaceae familyası ve *Triticum* cinsi içindeki buğday sınıfına (Triticeae) aittir (Levy ve Feldman. 2022). Bu türlerin dışında, aynı cinste bulunan *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* (yabani siyez buğdayı) gibi diğer bazı önemli türler de mevcuttur. Dört genomlu makarnalık buğdayın atası olan bu tür, hastalıklara karşı direnç (Yaniv vd. 2015) ve besinsel iyileştirmeler (Peleg vd. 2009) için potansiyel sunmaktadır. Poliploid buğdayın A genom donörü olan *Triticum urartu*, glutenin alt birimlerinde bol miktarda varyasyon göstermekte olup, geniş bir coğrafi dağılıma ve yüksek genetik çeşitliliğe sahiptir (Avni vd. 2014). Bu büyük genomlar, bu organizmaların *in vitro* manipülasyona karşı direnç göstermelerine (Fahmy vd. 2006) ve genetik transformasyonlara karşı gösterdikleri inatçı yapıya (Yadav vd. 2020a) neden olmaktadır.

Etkili *in vitro* rejenerasyon protokolleri, düzenlenmiş hücrelerin başarılı bir şekilde tam bitkilere dönüştürülebilmesini ve böylece CRISPR-Cas9 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeat) tarafından tanıtilen istenen genetik değişikliklerin kalıcı olarak miras kalmasını sağlar. Bu, bitki ıslahında hassas ve verimli değişikliklere olanak tanıyan en sağlam teknolojilerden biridir (Fidan vd. 2023). CRISPR bağlantılı protein 9 (Cas9) sistemi, son zamanlarda bölgesel olarak özgün çift sarmallı DNA kırıklarının tanıtımı için geliştirilmiş bir araçtır (Bortesi ve Fischer. 2015). Hikayesi, 1980'lerde bakterilerde tekrarlayan DNA dizilerinin (CRISPR) keşfiyle başlamıştır. Mojica vd. (2005) 2000'lerin başında bu dizileri kısa viral DNA parçacıklarıyla ilişkilendirerek bağışıklıkta potansiyel bir role işaret edene kadar işlevi belirsizdi. Ancak 2000'li yılların ortalarında bilim insanları dikkat çekici CRISPR-Cas sistemini çözmüştür. Bakterilerin CRISPR dizilerini geçmiş viral karşılaşmaların parçacıklarını depolamak

için bir hafıza bankası olarak kullandıkları artık bilinmektedir (Barrangou vd. 2007). Bir virüs saldırdığında, Cas proteinleri eşleşen viral diziyi tanır ve viral DNA'yı keserek istilacıyı etkili bir şekilde etkisiz hale getirir (Brouns vd. 2008). Elde edilen bu çığır açıcı gelişme, Jinek vd. (2012) tarafından kendi amaçları için kullanılmıştır. Araştırmacılar, bir organizmanın genomu içinde belirli genleri hedeflemek üzere tasarlanmış rehber RNA molekülleri ile CRISPR'ı yeniden programladılar. RNA tarafından yönlendirilen Cas proteini daha sonra hedeflenen DNA'yı keserek hassas genom düzenlemesine olanak sağlamıştır (Jinek vd. 2012). Bilim insanlarının belirli genleri hedefleyerek hastalık direnci veya gelişmiş verim gibi faydalı özellikler sunmasına olanak tanır. Ayrıca, kuraklığa tolerans gibi özelliklere ince ayar yapmak için mevcut genler düzenlenebilir (Gowda vd. 2020). Belki de en önemlisi, CRISPR-Cas sistemi ile geleneksel, daha yavaş ve daha klasik yöntemlere kıyasla ıslah programları önemli ölçüde hızlandırılabilir (Joshi vd. 2020). CRISPR-Cas, bitki ıslahında devrim yaratma konusunda muazzam bir potansiyele sahiptir. Gelişmiş hastalık direnci, daha yüksek verim ve iyileştirilmiş besin değeri ile yeni ve geliştirilmiş mahsul çeşitleri yaratma yeteneği sunar.

Buğdayda CRISPR-Cas sistemi, Cas9 enziminin ve rehber RNA'nın belirli genleri düzenlemek için buğday hücrelerine sokulduğu transformasyona dayanır. Bununla birlikte, buğday transformasyonu diğer bitkilere kıyasla önemli bir zorluk teşkil etmektedir. Başarılı bir dönüşümden sonra bile, araştırmacıların düzenlenmiş hücrelerden bütün buğday bitkilerini yeniden üretmeleri gerekmektedir (Mao vd. 2019). Ne yazık ki, buğday için mevcut rejenerasyon yöntemleri verimsizdir ve birçok düzenlenmiş hücre bu süreçte hayatta kalamaz. Bu düşük rejenerasyon oranı, istenen genetik modifikasyonların analizi ve tanımlanması için mevcut düzenlenmiş bitki sayısını sınırlayarak çalışmaların ilerlemesini engellemektedir.

Bu araştırma ile yukarıda belirtilen araştırma boşluklarını doldurmak için hem ekmeçlik buğday (*Triticum aestivum*. L) hem de makarnalık bazı buğday (*Triticum turgidum* Desf.) çeşitlerinde, yüksek sayıda haploid ve DH bitkilerin androgenesis yoluyla (mikrospor ve anter kültürü ile) üretilmesi için gerekli ortam protokollerinin geliştirilmesi ve aynı zamanda skutellum ve yaprak segmentleri kullanılarak yüksek verimlilikte somatik bitkilerin elde edilebileceği etkili somatik embriyogenesis protokollerinin oluşturulması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK TARAMASI

Buğday, dünya genelindeki en temel gıda maddelerinden biri olarak özellikle ıslahına ve yetiştiriciliğine yönelik birçok araştırmaya konu olmuştur (Tadesse vd. 2013). Haploidizasyon ve somatik embriyogenesis gibi gelişmiş bitki biyoteknolojisi teknikleri, buğdayın genetik iyileştirilmesi ve çeşit geliştirilmesinde önemli rol oynar (Dunwell 2010). Buğdayda androgenesis; genetik varyasyonun hızlı bir şekilde oluşturulması ve saf hatların elde edilmesi için kullanılır (Kumari vd. 2009). Öte yandan, somatik embriyogenesis bitki rejenerasyonu ve transgenik bitkilerin üretimi için değerli bir yöntemdir (Ramírez-Mosqueda 2022).

Buğdayda androgenesis ve somatik embriyogenesis üzerine yapılan araştırmalarda bu süreçlerin özellikle genotip, eksplant tipi, kültür ortamları ve kültür koşulları gibi bir dizi faktör tarafından nasıl etkilendiği ayrıntılı olarak incelenmiştir (Bajaj 1990). Bu bölümde, buğdayda haploidizasyon ve somatik embriyogenesis çalışmalarının önemli bir derlemesi sunulmakta ve bu tekniklerin tarihçesi, gelişimini etkileyen faktörler ve bu alandaki önemli bulgular ele alınmaktadır.

2.1. Buğdayda haploidizasyon - Androgenesis çalışmaları

Çoğu bitkide ticari çeşitlerin geliştirilmesinde doubled haploidlerin başarılı kullanımı, haploidleri indüklemek için büyük ölçüde etkili bir protokole bağlıdır (Slama-Ayed vd. 2019b) Haploidler, erkek veya dişi gametofitik kromozom sayısına sahip bitkilerdir ve bu sayı iki katına çıkartılabilir (Ari 2006). Erkek gametofit kültürüne dayalı androgenesis teknikleri; anter kültürü (Chu vd. 1973), mikrospor kültürü (Mejza vd. 1993) ve shed mikrospor kültürlerini (Wei 1982) içerir ve bu teknikler birçok tahıl türü, özellikle de buğday (Kanbar vd. 2020b; Sharafat vd. 2023; A. Touraev vd. 1996), mısır (Zheng vd. 2003a, 2003b) ve arpa (Cai vd. 1992; Gomez-Pando vd. 2009) için haploid bitki eldesinde kullanılan en yaygın yöntemlerdir. Haplod bitki elde etmek için kullanılan diğer alternatif yöntem tozlanmamış ovül / ovaryum kültürü ile indüklenen gynogenesis yoluyla haploid bitki oluşumudur (Ayed Slama ve Slim Amara. 2021). Gynogenesis çeşitli türlerde haploid bitkiler üretmek için başarılı bir yöntem olduğunu kanıtlamıştır.

In vitro androgenesis yoluyla DH buğday üretimi için çoğunlukla, anter veya izole edilmiş mikropor olmak üzere iki tip eksplant kullanılmaktadır. Buğday ıslahı ve genetik çalışmalarında DH bitkilerin üretilmesi için anter kültürü yöntemi yaygın olarak

kullanılmaktadır. Anterlerin direkt kültüre alındığı anter kültürünün en önemli avantajı uygulama kolaylığı olup, şimdiye kadar yaklaşık 170 türde haploid üretimi için anter kültürü uygulanmıştır (Richa 2022). Buna karşılık; genotipe bağlı verimlilik, mikrospor kültürüne kıyasla daha düşük haploid indüksiyon oranına ve somaklonal varyasyon potansiyeli gibi dezavantajlara sahiptir. Mikrospor kültüründe ise anterlerden mekanik olarak izole edilen mikrosporlar direkt olarak kültüre alınmaktadır (Mejza vd. 1993). Bu yöntem mikrospor ortamı üzerinde doğrudan kontrol sağladığı için daha yüksek verimliliğe ve homojen gelişime sahiptir. Ayrıca diploid rejenerasyon riskinin az olması en önemli avantajıdır. Fakat teknik olarak zahmetli, yoğun iş ve farklı genotipler için optimize edilmiş koşullar gerektirmektedir.

2.1.1. Buğdayda anter kültürü çalışmaları

Anter kültürü tekniği birçok buğday ıslah programında başarıyla uygulanmış ve DH üretim tekniğinin etkinliğini artırmaya yönelik çalışmalar yürütülmüştür (Patial vd. 2017). DH buğday bitkilerine olan ilgi, keşfedilmelerinden itibaren hep devam etmektedir (Gaines ve Aase. 1926). Buğdayda haploid bitki üretim çalışmaları 1970'lerin başlarında anter kültürü ile başlamıştır (Chu vd.1973). *In vitro* kültür koşullarının iyileştirilmesiyle, buğdayda anterlerden embriyo indüksiyon oranı son derece artmıştır. Bu nedenle anter kültürü artık buğday ıslahında rutin olarak kullanılmakta (Bajaj 1990) olup, bu yöntemle pek çok DH çeşit geliştirilmiştir (de Buyser vd. 1987).

Örneğin, ilk DH buğday çeşidi (Florin) Fransa'da de Buyser ve arkadaşları (1987) tarafından tescil edilmiştir.

Buğdayda anter kültürü teknikleri, son yıllarda önemli ölçüde ilerlemeler kaydetmiştir. Geçmişten günümüze buğdayda yapılan bazı anter kültürü çalışmalarına aşağıda yer verilmiştir:

Schaeffer vd. (1979) 17 farklı buğday çeşidini kullandıkları çalışmada orta tek çekirdekli safhadaki mikrosporları içeren anterleri patates ortamında kültüre almışlardır. Rejenerasyon içinse 1 mg/L indol-3-asetik asit (IAA) ve 0.1 mg/L kinetin eklenmiş MS katı ortamı kullanılmıştır. Çalışmada 8 genotipten toplam 60 embriyo elde edilmiş, bunlardan da 21 yeşil bitki ve 15 albino bitki elde edilmiştir. Bu araştırma, buğday anter kültürü için özel ortam bileşimlerinin etkinliği konusunda değerli bilgiler sağlamış ve albino bitki üretimi ile ilgili zorlukları vurgulamıştır.

Marsolais vd. (1986) kışlık hibrit buğdaylarda yaptıkları anter kültürlerinde orta tek çekirdekli aşamadaki mikrosporları içeren başakları kullanmışlar ve bunları anter kültüründen önce iki saat boyunca %0,1 pektolizaz ile ön işleme tabi tutmuşlardır. İndüksiyon ortamı bileşenleri BAC I besinleri, 100 g/L Fikol, 8 mg/L 2,4-D, 2000 mg/L inositol, 60 g/L sukroz ve 17.5 g/L glukozdan, takviye ortamı ise BAC I besinleri, 100 g/L Fikoll, 1 mg/L IAA, 30 g/L sukroz ve 17,5 g/L glukozdan oluşturulmuştur. Rejenerasyon ortamı olarak 1 mg/L IAA, 1 mg/L kinetin, 146 mg/L glutamin ve %0,7 agar içeren MS ortamı kullanılmıştır. Bu çalışmada, her 100 anter başına ortalama 11.19 yeşil bitki ve 27.7 embrioid üretilmiş ve beş melezden 450 yeşil bitki elde edilmiştir. Ancak bazı genotipler albino bitki üretmiştir.

Armstrong vd. (1987) 4 buğday genotipi kullandıkları anter kültürü çalışmasında mikrosporların çoğunun orta ila geç tek çekirdekli aşamada olduğu başakları topladıktan sonra 6 °C'de karanlıkta 7 gün boyunca inkübe etmiştir. Kullanılan indüksiyon ortamı, 1,5 mg/L 2,4-D; 0,5 mg/L kinetin ve %10 (a/h) Fikoll 400 içeren sıvı P1 ortamı iken, rejenerasyon için katı MS ortamı kullanılmıştır. Sonuçta tüm genotiplerden 100 anter başına toplam 16.1 yeşil bitki ve 6 albino bitki üretilmiştir.

Lashermes (1992)'in Veery's ve Hodhod yazlık buğday genotiplerini kullandığı anter kültürlerinde 750 mg/l glutamin ve sadece 165 mg/l NH₄NO₃ içeren modifiye edilmiş MS temel ortamını kullanmıştır. Ortama ayrıca 0,5 mg/l 2,4-D, 30 g/l maltoz ve 60 g/l arpa nişastası eklenmiştir. Rejenerasyon ortamı, 34,2 g/l sukroz, 1 mg/l IAA içeren MS ortamının yanı sıra süreci geliştirmek için eklenen gümüş nitrat ve aktif kömürden oluşturulmuştur. Çalışma sonucunda 100 anter başına 66 embrioid elde edilmiş, Veery's genotipinde 100 anter başına 18 bitki üretilmiş ve ayrıca 100 anter başına 2 albino bitki oluşmuştur.

Navarro-Alvarez (1992) buğday anter kültürü için indüksiyon ve rejenerasyon ortamlarında farklı şekerlerin etkisini incelemiştir. Üç buğday genotipinden alınan anterler Liang'ın 8SD12 ortamında çeşitli şekerler, 2 mg/L 2,4-D, 1 mg/L NAA, 254 mg/L glutamin ve %5 buğday nişastası ile kültüre alınmıştır. Maltoz, 100 anter başına 105 embriyo; glukoz, 47 embriyo; maltoz + glukoz, 37 embriyo üretmiş ve bunların hepsi sukrozdan 24 embriyo daha iyi performans göstermiştir, Galaktoz ve Mannoz etkisiz olmuştur. Rejenerasyon için, embriyolar aynı şeker veya sukroz kullanılarak gruplara ayrılmıştır. Rejenerasyon ortamı Liang's 85D12 tuzları, 0.06 M/L şeker ve %7 buğday

nişastası içermektedir. En fazla bitki rejenerasyonu Pavon 76'da (%36.7) görülürken, onu Centurk (%30.8) ve Arapahoe (%1.7) takip etmiştir. Pavon 76, Centurk'e (%3.4 ve %13) kıyasla daha fazla albino (%8.4) ve çift haploid (%23) üretmiştir. Genel olarak, çalışmada 59 yeşil bitki ve 26 albino bitki olmak üzere toplam 189 embriyo üretilmiştir.

Trottier vd. (1993) 5 yazlık buğday genotipinde farklı ortamların anter kültürü üzerindeki etkilerini farklı denemelerle incelemiştir. İlk denemede, ortama 19 amino asit (bu 19 amino asidin dozları 2.5 mg/L'den 975 mg/L'ye kadar değişmektedir) eklenmesinin embriyo ve yeşil bitki sayısını önemli ölçüde artırdığını, HY320 ve B723 genotiplerinde yeşil bitki sayısının 100 anter başına 28.2'den 46.7'ye arttığını ortaya koymuştur. İkinci denemede; HY320, Wim ve Laval-19 genotipleri katı ortam (0 bitki), jelatinli ortam (2.5 bitki) ve sıvı ortamda (0 bitki) karşılaştırıldığında, Fikollü sıvı ortamın 100 anter başına 9.9 yeşil bitki üreterek en etkili ortam olduğu bulunmuştur. Yapılan üçüncü denemede sukrozun maltoz ile değiştirilmesinin farklı etkileri olduğu ortaya konulmuştur. Maltoz HY320, Wim ve Reliance'da androgenesis kısmen engellemiş (sukroz ile 100 anter başına 40.3'e karşılık 100 anter başına 43.9 yeşil bitki), ancak Laval-19'da önemli ölçüde artırmıştır (sukroz ile 100 anter başına 10.8'e karşılık maltozla 100 anter başına 5.4).

1993 yılında Masojć ve diğerleri, kullanarak 43 yazlık buğday çeşidi ve 6 F1 melezinin anterlerini modifiye N6 ortamında (HNG) kültüre almışlardır. Yüksek verimde embriyoid oluşumunun (her 100 anterde 111'e kadar), düşük yeşil bitki rejenerasyonu (her 100 embriyoidde 9.1'e kadar) ve yüksek oranda albino bitki (%63) ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir. Anterlerin androjenik tepkisi genotipe göre önemli ölçüde değişmiştir. Yedi çeşitten 100 anter başına 1 yeşil bitki üretilirken, 10 genotipten hiç yeşil bitki elde edilememiştir. F1 melez genotipleri ebeveyn çeşitlere kıyasla farklı tepkiler göstermiştir. Resiprokal melezlemelerdeki farklılıklar anter tepkisi üzerinde sitoplazmik etki olduğunu düşündürmüştür. Rejenerantların %45'i haploid, %29'u spontan DH ve %26'sı ise anormal kromozom sayısına sahip bulunmuştur. Bu çalışma, genotip ve sitoplazmik faktörlerin yazlık buğdayda anter kültürü başarısı üzerindeki etkisini vurgulamıştır.

Holme vd. (1999), %9 maltoz ile desteklenmiş CHB-2 ortamı kullanarak 145 çeşitte androgenesis indüksiyonunu araştırmıştır. Mikrosporları orta-geç çekirdekli aşamada olan başakları seçmişler ve 1-7 gün boyunca 5 °C'de soğuk su ile ön işleme tabi

tutmuşlardır. Soğuk su uygulamaları, anter kültürü verimliliğinde önemli farklılıklar olduğunu göstermiştir: Doğu Avrupa çeşitleri 100 anter başına 61.5 embriyo ve 3.6 yeşil bitki üretirken, Kuzey Batı Avrupa çeşitleri 100 anter başına 17.6 embriyo ve 0.4 yeşil bitki oluşturmuştur. Bu bulgular, genotip ve çevresel koşulların buğday androgenesis potansiyeli üzerindeki etkisini ortaya koymuştur.

Kim ve Baenziger (2005), üç farklı ortam kullanarak yazlık buğday 'Pavon 76'da androgenesis indüksiyonunu araştırmıştır. Ayrıca donör bitki başaklarına 1-2 hafta boyunca 48°C'de ön muamele uygulamışlardır. Bitki rejenerasyonu için 100 anterden 22'ye kadar yeşil ve 25'e kadar albino bitki üretilmiştir.

Soriano vd. (2008), Pavon ve Caramba yazlık buğday çeşitlerinde androgenesis indüksiyonunu araştırmışlardır. Orta ila geç tek çekirdekli aşamadaki mikrosporlara sahip anterleri çeşitli bütanol muamelelerinin yanı sıra maltoz, 2,4-D ve BA ile desteklenmiş sıvı MS3M ortamında kültürlemeden önce mannitol, CaCl₂ ve makro besinler içeren bir çözelti ile ön muameleye tabi tutmuşlardır. Çalışma, n-butanolün embriyo üretimini önemli ölçüde artırdığını ve Caramba'nın n-butanol uygulaması altında 100 anter başına 330 embriyo ve 169 yeşil bitki ile en yüksek verimi gösterdiğini ortaya koymuştur. N-butanol kullanılan bu çalışmada, bu kimyasalın buğday androgenesisinde etkili bir ajan olabileceğini bildirilmiştir.

Khiabani vd. (2008), dokuz İran buğday genotipini kullanarak, bir hafta boyunca yaklaşık 4°C'de soğuk ön işlemin ardından orta ila geç tek çekirdekli mikrosporlara sahip başakların anterlerini kültüre almışlardır. İndüksiyon ortamı olarak Modifiye P4 ve rejenerasyon için 190-2 kullanmışlardır. Çalışmada, kaydedilen en yüksek kallus üretimi (31.54) F32044 genotipinden ve en yüksek bitkicik üretimi (100 anter başına 24) F3 2005 genotipinden elde edilmiştir. Bu bulgular, buğday androgenesisinde genotipe özgü tepkilerin altını çizmiştir.

Broughton (2011), Avustralya yazlık buğday genotiplerinde n-butanol ve diğer bazı kimyasalları kullandığı anter kültürlerinde embriyo ve yeşil bitki üretimini artırmayı amaçlamıştır. Katı mannitol ortamında anter ön muamelesini takiben %0.1 veya %0.2 (h/h) n-butanol ile 5 saatlik bir muamele embriyo, yeşil bitki ve DH üretimini önemli ölçüde arttırmıştır. Özellikle, yeşil bitki üretimi melez genotiplerde 3 ila 6 kat artmıştır. Mannitol ön muamele ortamına kalsiyum (Ca) ve makro besin maddelerinin eklenmesi, n-bütanol ile birleştirildiğinde sonuçları daha da iyileştirmiştir. En iyi sonuçlar n-butanol

ve Ca/makro besin ön muamelesinin birlikte uygulanmasıyla elde edilmiş ve 100 anter başına 200'e kadar yeşil bitki elde edilmiştir.

El-Hennawy vd. (2011), 6 buğday genotipinin ve bunların F1 melezlerinin anter kültürü tepkilerini araştırdığı çalışmada önemli genetik varyasyonları ortaya koymuştur. Kallus oluşumu tüm genotiplerde meydana gelmiş, kallus indüksiyon oranları Gemmeiza-9'da %0.67 ile Gemmeiza-7 × Sids-4 melezinde %18 arasında değişmiştir. Bitki rejenerasyonu 21 genotipin 19'unda başarılı olmuş, en yüksek yeşil bitkicik frekansları Giza-164 × Gemmeiza-9 ve Giza-164 × Line-115 melezlerinde gözlenmiştir. Melezler genellikle ebeveynlerinden daha iyi anter kültürü tepkileri göstermiş, kallus indüksiyonu ve yeşil bitki rejenerasyonu için önemli heterotik etkiler göstermiştir.

Lantos vd. (2013) , yüksek ve düşük tepkili genotipler olan 'Svilena' ve 'Berengar' ile 93 F1 kış buğdayı melezini anter kültüründe test etmiştir. İndüksiyon için agarı Fikoll ile değiştirerek modifiye W14 ortamını ve rejenerasyon için 190-2 ortamını kullanmışlardır. Çalışmada, genotipin embriyo benzeri yapıların, rejenere olmuş bitkiciklerin ve yeşil bitkiciklerin sayısını önemli ölçüde etkilediği ve yeşil bitkicik üretiminin 100 anter başına 0.04 ila 28.67 arasında değiştiği bulunmuştur. Tüm melez genotiplerden toplam 11.000'in üzerinde iyi köklenmiş yeşil bitkicik (ortalama rejenerasyon oranı 100 anter başına 5.3 yeşil bitkicik) elde edilmiştir. Genotip, yıl ve çevresel faktörlerin albino bitkicik üretimi üzerindeki etkisine rağmen, iklimlendirme sonrasında yeşil bitkiciklerin hayatta kalma oranı 2010 yılında %97.21 ve 2011 yılında %96.34 olmuştur. Bu çalışma, anter kültürünün kışlık buğday ıslahı için etkili ve uygun maliyetli bir yöntem olduğunu ve yılda 5.000'den fazla yeşil bitki fidesi üretilebileceğini ortaya koymuştur.

Castillo vd. (2015), yumurtalık ile ön muamele uygulanmış ortam (OVPCM) ve yumurtalık ortak kültürünü kullanarak ekmeklik buğday anter kültüründe yeşil DH bitki üretimini artırmayı amaçlamışlardır. 'Pavon' ve 'Caramba' gibi çeşitlerin kullanıldığı çalışmada Caramba orta-düşük düzeyde bir endrojenik tepki göstermiştir. Ayrıca Galeón, Tigre ve Kilopondio ile birlikte bu çeşitlerin yumurtalıkları kullanılmıştır. Yumurtalıklar 25°C'de 5 gün boyunca Fikoll 400 içeren MS3M ortamında kültüre alınmıştır. Orta-geç çekirdekli olmayan aşamadaki anterler mannitol ve CaCl₂ ile ön muamele edilmiş, ardından OVPCM'de kültüre alınmıştır. Sonuçlar, OVPCM'nin embriyoları ve yeşil bitkileri önemli ölçüde artırdığını ve özellikle Caramba'ya Pavon'dan daha fazla fayda

sağladığını göstermiştir. Olgun yumurtalıklar, olgunlaşmamış olanlara kıyasla sonuçları iyileştirmiştir. Tigre genotipinin yumurtalıkları, 100 anter başına 111 DH bitki üreterek en yüksek spontan kromozom katlanmasını (%71) sağlamıştır.

Echávarri ve Cistué (2016), tarafından yapılan çalışmada, buğdayda yeni bir ön muamele ortamının anter kültürü verimliliği üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Çalışmada 3 buğday çeşidi ve anter kültürüne farklı duyarlılık gösteren 10 F1 melezi kullanılmıştır. Ön muamele ortamı 0.7 M mannitol, 40 mM CaCl₂-2H₂O, FHG makro besin maddeleri, %0.8 Sea Plaque agaroz ve %1 DMSO dan oluşturulmuştur. DMSO ilavesi özellikle etkili olmuş, buğdayda yeşil bitki sayısını kontrole kıyasla iki kat ila dört kat artırmıştır. Ayrıca DMSO, androgenesis teknolojisinde önemli bir sınırlama olan albino bitkilerin yüzdesini azaltmıştır. Bu çalışma, ön muamele ortamındaki %1 DMSO'nun hem arpa hem de buğdayda anter kültürü verimliliğini artırabileceğini gösteren ilk çalışmadır. Bu bulgular, DMSO'nun buğday ıslahı sonuçlarını iyileştirmede değerli bir araç olma potansiyelini göstermektedir.

Başka bir çalışmada Dorota vd. (2020), buğday anter kültüründe Zearalenon (ZEN) ve çeşitli BGD lerinin mikrospor embriyogenesi üzerindeki etkisini araştırmıştır. Çalışmada 6 ortam kombinasyonu incelenmiştir. Bunlar; kontrolün yanında iki BGD kombinasyonu içeren D ortamı (2,4-D + dicamba) ve K ortamı (2,4-D + kinetin) ve her biri üç ZEN konsantrasyonu (0, 0.1, 0.2 mL/L) içeren ortamlardan oluşturulmuştur. ZEN ilavesi bazı genotiplerde mikrospor embriyogenesi etkinliğini ve yeşil bitki oluşumunu önemli ölçüde artırmış, 0.2 ml/L ZEN ile desteklenen D ortamı en etkili ortam olmuştur. Tüm genotipler androjenik yapılar üreterek genotipik inatçılığın kırıldığını göstermiştir. Ayrıca, 19 melezin 18'inden yeşil bitki elde edilmiştir. ZEN ilavesi rejenere albino bitkilerin sayısını ve kendiliğinden genom katlama oranını ise etkilememiştir. Bu çalışma, ZEN'in buğday anter kültüründe mikrospor embriyogenesini geliştirme potansiyelini ortaya koymuştur.

Broughton vd. (2020), anter kültürü kullanarak buğday DH üretimindeki zorlukları, özellikle yeşil bitki rejenerasyonundaki genotip değişkenliğini ve spontan kromozom katlanmasını araştırmıştır. Çalışmada erken genom katlanma oranını artırmak için indüksiyon aşamasının başında kafein veya trifluralin uygulanmıştır. Kafein uygulaması (24 saat boyunca 0.5 mM konsantrasyonda), altı yazlık buğday melezinin ikisinde yeşil bitki üretimini 30 anter başına sırasıyla 161 adet (%14) ve 42 (%27) adet

yeşil bitki olacak şekilde önemli ölçüde artırmıştır. Bununla birlikte, kafein, kontrole (%56) kıyasla bazı uygulamalarda (%67-68) kromozom katlama sıklığında gözlenen bir artışa rağmen, kromozom katlamasını istatistiksel ölçüde etkilememiştir. Trifluralin uygulaması (48 saat) kromozom katlanmasını %38'den (kontrolde) 1 µM ve 3 µM uygulamalarında sırasıyla %51 ve %53'e kadar önemli ölçüde iyileştirmiştir. Fakat trifluralin yeşil bitki rejenerasyonunu olumsuz etkilemiş, 20 anter başına 31.8 yeşil bitkiden (kontrol) trifluralin uygulamalarında 20 anter başına 9-25 yeşil bitkiye oluşmuştur.

Dorota vd. (2020b), 4 yazlık buğday çeşidinde iyonik sıvının mikrospor embriyogenezi üzerindeki etkisini değerlendirmiştir. İndüksiyon için 2,4-D ve dicamba ve bu sentetik oksinlere benzer yapılara sahip yeni iyonik sıvılar ile desteklenmiş modifiye bir C17 ortamı kullanılmıştır. Çalışmada C2 olarak etiketlenen 2-kloroetil amonyum 2,4-diklorofenoksi asetat [CC][2,4-D]; TM olarak etiketlenen Trimetilvinylamonyum (2,4-diklorofenoksi) asetat [TMWA][2,4-D]; CD olarak etiketlenen 2-Kloroetil trimetilamonyum 2,6-dikloro-2-metoksibenzoat [CC][dikamba] lı indüksiyon ortamları ile %0.6 agar ile katılaştırılmış, 0.5 mg/L NAA ve kinetin içeren MS ortamı kullanılmıştır. Tek çekirdekli mikrospordan embriyogenesis indüksiyonu tüm uygulamalarda gözlenmiş ve toplamda 873 embriyojenik yapı (ES) elde edilmiştir. İyonik sıvıların eklenmesi mikrospor embriyogenesisini ve yeşil bitki rejenerasyonunu sadece 2,4-D içeren kontrol ortamından daha etkili bir şekilde uyarmıştır. En uygun uygulamalar, kontrole kıyasla mikrospor embriyogenesis indüksiyonunda iki kattan fazla verimlilikle sonuçlanmıştır. En yüksek verim (14.17 ES/100 anter) CD/C2 ortamında gözlenmiştir. CD/2,4-D ortamında ortalama yeşil bitki rejenerasyonu 2.5 yeşil bitki /100 anter olmuştur.

Zambriborshch vd. (2023), kışlık ekmeklik buğdayın 9 genotipinde yapılan anter kültürlerinde başaklar önce 0.5 mg/L absisik asit çözeltisine daldırılmış, streç film ile sarılmış ve 3-5 gün boyunca +2-4 °C'de saklanmıştır. Sterilizasyon, 40 dakika boyunca sodyum hipoklorit (NaOCl) ve alkaliler içeren Bilyzna çözeltisinde yapılmıştır. Ardından 10 dakika boyunca 0.05N HCl ile durulama ve steril damıtılmış su ile yıkama yapılmıştır. İndüksiyon için 90 g/L sukroz, 400 mg/L L-glutamin, 400 mg/L L-prolin, 100 mg/L miyo-inositol, 3 g/L gelrite ve 2,4-D (1,5 mg/L) ve kinetin (0,5 mg/L) içeren BGD lerle desteklenmiş 190-2 ortamı kullanılmıştır. Rejenerasyon ortamı ise MS1 temel besin

ortamına eklenen 0.2 mg/L 2,4-D, 0.5 mg/L kinetin, 200 mg/L L-glutamin, 200 mg/L L-prolin, 100 mg/L myo-inositol, 6 g/L agar ve 60 g/L sukrozdan oluşturulmuştur. En yüksek embriyo benzeri yapı 114.39 ELS/100 anter iken, yeşil bitkicikler (yb) 0 ila 3.05 yb/100 anter arasında değişmiş ve ortalama 0.71 yb/100 anter olmuştur. Rejenere edilen 100 yeşil bitkicik başına aklimatize bitki sayısı (AB) 32 ila 62.5 AB /100 yb arasında değişmiş, ortalama 35.92 AB /100 yb olmuştur. Buna ek olarak, 100 aklimatize bitki başına 12.5 ila 60 DH bitki (DH/100AB) geri kazanılmış ve ortalama geri kazanım oranı %29.41 olmuştur. Bu çalışmada, 9 genotipten 5'inden, kompleks pas direncine sahip (8-9 puan) 17 DH hat da dahil olmak üzere başarılı bir şekilde fertil bitkiler elde edilmiş ve iki direnç geni kümesi (Lr26/Sr31/Pm8/Yr9 ve Lr34/Yr18/Sr58/Pm38) tanımlanmıştır.

2.1.2. Buğdayda mikrospor kültür çalışmaları

Androgenesisde haploid bitki elde etmek için başvurulacak bir başka yol izole edilmiş mikrosporların kültürüdür. Tek hücreli haploid kaynağı olan mikrosporlar temel ve uygulamalı biyoteknolojik ıslah programları için umut verici bir araç olmuştur (Bajaj 1990). Mikrosporlar, sıkı bir şekilde kontrol edilen olaylar dizisini takiben haploid bitkilere dönüşmek için önemli bir kapasiteye sahiptir. Bu süreç iki ana bölüme ayrılabilir; mikrosporogenesis ve mikrogametogenesis. Mikrosporogenesis mayoz bölünme ile başlar ve polarize haploid mikrosporların oluşumu ile tamamlanır. Mikrogametogenesis boyunca, tek hücreli mikrospor asimetrik olarak bölünerek, bir vejetatif hücre ve bir generatif hücre içeren genç bir polen tanesine dönüşür ve bu da daha sonra olgun, iki hücreli veya üç hücreli bir polen tanesine farklılaşır (Touraev vd. 1997).

Mikrospor kültürü tekniği, anter kültürlerine göre birçok avantajı olması nedeniyle son derece umut verici ve etkili bir yöntemdir. İlk olarak, anter içindeki sınırlı alan ve beslenmeden kaynaklanan istenmeyen seçilimi engeller. İkinci olarak, somatik, diploid anter dokusu ile kontaminasyon riskini ortadan kaldırmaktadır. Üçüncü olarak, bu yöntem mikrospor gelişiminin daha hassas bir şekilde gözlemlenmesini sağlamaktadır. Ayrıca, mikrosporlar tek hücreli organizmalar olarak yetiştirilebilir ve mikrobiyolojik tekniklerin kullanılmasına imkan sağlamaktadır. Bu tek hücreli sistem aynı zamanda tek tek hücreler arasında *in vitro* seleksiyonu kolaylaştırır ve mutagenesis ve transformasyon gibi genetik manipülasyon için yeni imkanlar sunmaktadır. Ayrıca, mikrosporlar direkt olarak embriyolara dönüşebildiğinden, androgenesisin fizyolojisi ve biyokimyasını incelemek

için değerlidirler. Son olarak, izole edilmiş çok hücreli mikrospor embrioidlerine mikroenjeksiyon yoluyla direkt gen transferi, buğday da dahil olmak üzere tahıllarda yüksek rejenerasyon verimliliğine sahip izole mikrospor kültürleri kullanılarak transgenik bitkiler oluşturma potansiyeli sağlamaktadır (Bajaj 1990; Neuhaus vd. 1987; Potrykus 2007).

Mikrospor kültürünün aşamaları; uygun mikrospor gelişim aşamasının belirlenmesi, kültür öncesi veya sonrası ön muamele, mikrosporların izolasyonu, mikrosporların indüksiyon ortamında kültürü, embrioidlerin rejenerasyon ortamına aktarılması, iyi gelişmiş rejeneratların aklimatizasyonu, *ex vitro* bitkilerin ploidi seviyesinin belirlenmesi ve gerekirse kromozom katlamasından oluşmaktadır ve tüm bu aşamalar buğday mikrospor kültürü süreci için de geçerlidir.

Nitsch'in (1973) *Nicotiana*'nın izole mikrospor kültürünü rapor etmesinden itibaren, anterlerden mekanik olarak izole edilen mikrosporların kültürü veya sıvı kültür ortamı üzerinde yüzdürülen anterlerden dökülen mikrosporların gelişimi (shed-mikrospor kültürü) birçok tahılda sınırlı başarı ile araştırılmıştır (Bajaj 1990). Birkaç yıl sonra, bu teknik buğdaya uygulanmış ve kültüre alınan dört genotipten üçünün mikrosporlarından yeşil bitkilerin rejenerasyonu ile sonuçlanmıştır. Geçmişten günümüze buğdayda yapılan bazı mikrospor kültürü çalışmalarına aşağıda yer verilmiştir:

Mejza vd. (1993), yazlık buğday çeşitlerinden UC703, Pavon, Colano ve Chris'de mikrospor kültürü çalışması yapmışlardır. İndüksiyon ortamı olarak %9 maltoz içeren modifiye FMN6 ve CHB-2 ortamlarını ve bitki rejenerasyonu için %3 sukroz içeren hormonsuz MS ortamını kullanmışlardır. Orta ila geç çekirdekli aşamadaki mikrosporlar, blender vasıtasıyla anterlerden izole edilmiş ve farklı sıcaklıkta ön muameleye tabi tutulmuştur. 25°C'de başak ön muamelesi, 5°C'ye kıyasla daha fazla mikrospor kaynaklı embriyo üretirken, indüksiyon ortamı olarak ise CHB-2 ortamı FMN6 ortamına göre daha fazla MDE üretmiştir. Ayrıca mikrosporların arpa yumurtalıkları ile ortak kültürü buğday yumurtalıklarına kıyasla daha fazla üretmiştir. Rejenere bitkilerin fertilite seviyesi yaklaşık %40 olarak tespit edilmiştir.

Turesson ve Ohlund (1993)'ın iki yazlık buğday çeşidi ('Walter' ve 'Ciano') ve iki kışlık buğday çeşidi ('Sleipner' ve 'Curiosita') üzerinde yaptıkları mikrospor kültürü çalışmasında, +2 - +3°C'de 3 hafta boyunca karanlıkta soğuk ön işlem uygulanmış, ardından mikrosporlar %9 maltoz, 1.5 mg/L 2,4-D ve 0.5 mg/L kinetin içeren 190-2

ortamında kültüre alınmıştır. Dört genotipten de proembriyolar, embriyolar ve bitkiler üretilmiştir. Çalışmada toplam 83 makroskopik embriyo gelişmiş ve 45'i bitkiye dönüşmüştür. Bitki üretimiyle ilgili olarak; 'Ciano' dan 17 bitki (14 yeşil, 3 albino) rejenere edilirken, 'Walter' dan tamamı albino olmak üzere 28 bitki rejenere edilmiştir.

Gustafson vd. (1995) nin buğdayda yaptıkları izole mikrospor kültürlerinde Chris' ve 'Pavon 76' geotipleri kullanılmıştır. Başaklar mikrosporlar geç tek çekirdekli ile erken çift çekirdekli aşamada iken toplanmış ve anterler çıkarılana kadar 1 ila 4 gün boyunca + 4°C'de saklanmıştır. Mikrosporların blending yöntemi kullanılarak izole edilmesi ve sukroz gradyan sistemi ile santrifüjde ayrıştırıldıktan sonra mannitol kullanımının mikrosporların canlılıkları üzerinde zararlı bir etkisi oluşturduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar, mannitol kullanılmaksızın izole edilen mikrospordan 109 rejenere bitki elde edilmiş olup, bunlar %46 fertilite oranına sahiptir.

(Zheng vd. 2001), kimyasal uygulama ile buğday başaklarından mikrosporları izole etmiş, izole edilen mikrosporları daha sonra 25°C'de 38-52 saat boyunca karanlıkta 0.18 mM 2-hidroksinikotinik asit, mineraller ve %9 maltozdan oluşan bir ortama tabi tutmuştur. %21'lik maltoz üzerinde filtrasyon ve gradyan santrifüjleme yoluyla ayrıştırmanın ardından, mikrosporlar 27 °C'de sıvı bir ortamda yumurtalıkların varlığında kültüre alınmıştır. İndüksiyon ortamı olarak NPB-99 ve rejenerasyon ortamı olarak 190-2 ortamı kullanılmıştır. Çalışmada başak başına 360 - 4.914 arasında embriyoid verimi elde etmiş, bunlardan %15 - %95'i yeşil bitkiye dönüşmüş ve DH bitki oranları %39 - %78 arasında bulunmuştur.

Zheng vd. (2002) DH buğday üretmek için daha verimli ve etkili bir izole mikrospor kültür sistemi geliştirmek amacıyla yaptıkları çalışmada, ön muamele solüsyonuna %10 NPB98 ortamı ekleyerek süreci geliştirmiş ve WED202-16-2 buğday genotipinde bitki rejenerasyon oranlarını %15 ve yeşil bitki yüzdesini %27 oranında artırmıştır. Araştırmacılar mikrospor embriyogenesisini indüklemek için kimyasal bir formülasyon oluşturduklarını ve muamele edilen mikrosporların %50 kadarını gametofitik yoldan sporofitik yola dönüştürdüklerini bildirmiştir. Formülasyon karışımı 0.1 g/L 2-hidroksinikotinik asit, 10^{-6} mol/L 2,4-D ve 10^{-6} mol/L 6-benzilaminopürin olarak açıklanmıştır. Bu embriyojenik mikrosporlar, sıvı NPB-99 ortamında buğday yumurtalıkları ile birlikte kültüre alınmış ve 8 buğday genotipinde başak başına 50 ila 5500 yeşil bitkinin rejenere olduğu bildirilmiştir.

Daha sonra yapılan çalışmalarda farklı araştırmacılar, yüksek albino bitki oluşum oranı, yeşil bitkilerin düşük oluşum oranı ve genotip bağımlılığı gibi mevcut sorunları çözmek için de araştırmalar yürütmüştür. Letrate vd. (2006) arabinogalaktanların (AG) ve arabinogalaktan proteinlerinin (AGP) iki yazlık buğday genotipi olan Chris ve Pavon 79 üzerindeki etkilerini test etmiştir. Araştırma bulguları, AG ilavesinin kültürde yumurtalıkların bulunup bulunmadığına rağmen, her iki genotipte de mikrospor ölümlerini önemli ölçüde azalttığını göstermiştir. Benzer şekilde, ortamdaki AGP varlığı üretilen embriyo sayısı ve yeşil bitkilerin rejenerasyonu üzerinde güçlü bir pozitif etki göstermiştir. Dikkat çekici bir şekilde, AGP yumurtalıklar olmaksızın tek başına kullanıldığında buğday mikrospor kültürlerinden yeşil bitkilerin üretilmesine katkı sağlamıştır. Genel olarak sonuçlar, buğday mikrospor kültürlerinde embriyogenesis indüksiyonunun, her ikisi de yüksek hücre ölüm oranlarını önlemeye ve yeşil bitki rejenerasyonunun verimliliğini artırmaya yardımcı olan AG veya AGP kullanımından güçlü bir şekilde etkilendiğini göstermiştir.

Cistué vd. (2006) ve Labbani vd. (2007), tarafından yürütülen iki önemli çalışma, izole mikrospor kültürleri kullanarak makarnalık buğdayda DH bitkileri üretmeye odaklanmıştır. Cistué ve arkadaşları genotip olarak beş ticari çeşit, bir seçilmiş hat ve ıslah değeri yüksek farklı genotipler arasında geliştirilen 20 F1 melezinden oluşan bir koleksiyon kullanmıştır. Anterleri 0.7 M mannitol içinde ön muamele etmişler, maserasyon yoluyla mikrosporları izole etmişler ve yumurtalık ko-kültürü ile C17 indüksiyon kültür ortamında kültüre almışlar ve optimum rejenerasyon ortamı olarak J25-8 ortamını kullanmışlardır. 35 mikrospor izolasyonundan, yaklaşık %67'si spontan DH olan 407 yeşil bitkicik elde etmişlerdir. Elde edilen bu 407 bitkiden 275'i tamamen verimli bulunmuş ve tarlada test edilebilecek kadar tohum üretmiştir. Diğer yandan, Labbani vd. (2007) aynı buğday tipinden Jennah Khetifa çeşidi ile çalışmışlardır. Toplanan başaklar 0.3 M mannitol içinde ön muameleye tabi tutulmuş ve +4 °C'de 3, 5, 6, 7, 8, 10 ve 12 gün boyunca farklı sürelerde muhafaza edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, 0.3 M mannitol ve 7 gün boyunca soğuk depolamasının birlikte kullanıldığı bir ön muamelenin, üretilen embriyo sayısı ve yeşil bitkilerin rejenerasyonu üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Bu koşullar altında, 2.693.500 mikrospordan 13.475 olgun embriyo üretmişler ve 85 yeşil bitki elde etmişlerdir. Çalışmada 100.000 mikrospor başına ortalama 11.55 yeşil bitki olmak üzere yüksek bir yeşil bitki rejenerasyon frekansı

kaydedilmiş olup, bu da yaklaşık olarak başak başına 6 bitkiye eşdeğerdir. Her iki çalışmada farklı metodolojiler ve sonuçlar olsa da, makarnalık buğday mikrospor kültürlerinde DH bitkilerinin üretimini artırmada belirli ön muamele ve kültür koşullarının etkinliğini göstermiştir. Cistué ve arkadaşları daha yüksek sayıda yeşil bitkicik ve önemli oranda spontan DH elde ederken, Labbani ve arkadaşları embriyo üretimini ve yeşil bitki rejenerasyonunu en üst düzeye çıkarmak için ön muamele koşullarını optimize etmeye odaklanmıştır.

Soriano vd. (2007) ile Islam (2010), kolhisinin buğday mikrospor kültürlerinde kromozom katlanması ve androjenik tepki üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Soriano ve arkadaşları, mannitol stresi ön muamelesi sırasında ve ilk 48 saat içinde 0, 150 ve 300 mg /L konsantrasyonlarda kolhisin uygulamasını yapmışlardır. Araştırmacılar, 300 mg/L kolhisin uygulamasının düşük yanıt veren genotiplerde kromozom katlanma oranını iyileştirdiğini ve DH24033 genotipinde kontrole göre %118 artış sağladığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte, kolhisinin embriyo oluşumu ve yeşil bitki yüzdesi üzerindeki etkisi genotipe bağlı bulunmuştur. Diğer taraftan, Islam'ın 2010 yılında yaptığı çalışma da ise izole edilmiş mikrospor kültürlerinin kolhisin ile direkt muamelesi incelenmiştir. Bu yöntemin embriyoid indüksiyonunu üç ila dört kat azalttığı, ancak fertil bitkilerin rejenerasyonunu iyileştirdiği bildirilmiştir. Ayrıca Islam, üç gün boyunca indüksiyon ortamına eklenen farklı kolhisin konsantrasyonlarını (50, 100 ve 150 mg/ L) test ettiği başka bir denemede, daha yüksek kolhisin konsantrasyonlarının embriyo sayısını ve rejenere yeşil bitkilerin oranını azaltırken, albino bitkilerin rejenerasyonunu teşvik ettiğini ortaya koymuştur. Embriyo sayısındaki azalmaya rağmen, çalışmanın birincil hedefi olan kromozom katlanma indeksi artmıştır. Üç uygulama arasında diploid bitkilerin ortalama sıklığı kontroldeki %72.40'a kıyasla %81.73'e yükselmiştir. Islam kolhisin uygulamasının ortalama kromozom katlanma sıklığını kontroldeki %55.26'ya kıyasla %84.94'e yükselttiğini bildirmiştir. Kısacası, her iki çalışma da kolhisin uygulamasının buğday mikrospor kültürlerinde kromozom katlanmasını önemli ölçüde iyileştirebileceğini göstermiştir. Soriano ve arkadaşları kolhisinin etkilerinin genotipe bağlı doğasını vurgularken, Islam'ın çalışması embriyo oluşumunun azalması ve kromozom katlanmasının artması arasında bir denge olduğunu göstermiştir. Her iki çalışma da kolhisinin, DH bitki üretimi için çok önemli olan kromozom katlanmasını

teşvik etmedeki etkinliğinin altını çizerken, buğday mikrospor kültürleri için kolhisin uygulamalarının optimize edilmesindeki zorlukları da ortaya koymuştur.

Asif ve araştırma grubu, tritikale ve yazlık buğdayda çeşitli uygulamaların mikrospor kültürleri üzerindeki etkilerini araştıran çeşitli çalışmalar yürütmüştür. Araştırmalar genel olarak antioksidan (2014), antibiyotik (2013), fitosülfokin alfa (2014a) ve indüksiyon ortamı osmolalitesinin (2014b) etkilerini belirlemek üzere yapılmıştır. Asif vd. (2013a) ilk çalışmalarında, mitokondriyal veya plastid antioksidanlarla desteklenmiş NPB-99 + %10 Fikoll den oluşan bir indüksiyon ortamı kullanmışlardır. Bu çalışma ilk olarak tritikalede yapılmış ve daha sonra çeşitli yazlık buğday genotiplerinde gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar buğday genotipine göre değişmiş, ancak prolin (10 mM) ile desteklenmiş indüksiyon ortamı hem tritikale hem de buğdayda daha fazla sayıda embriyo/embriyo benzeri yapı ve yeşil bitki üretmiştir. Test edilen plastid antioksidanlar arasında glutatyon (2 μ M) embriyo ve yeşil bitki üretimini artırmada en etkili olarak belirlenmiştir. Ek olarak, salisilik asit kullanımı tritikale ve SWS366 buğday genotipinde albino bitki sayısını azaltmaya yardımcı olmuştur. Asif vd. başka bir çalışmada (2013b), sefotaksim antibiyotiğinin kullanımını araştırmışlardır. Sefotaksimin (100 mg/L) buğday ve tritikale mikrospor kültürlerinde meydana gelen gram-negatif bakteriyel kontaminasyonu azalttığı, daha da önemlisi hücre büyümesini ve yeşil bitki üretimini arttırdığı bulunmuştur. Diğer çalışmalarında (2014a) indüksiyon ortamına eklenmiş fitosülfokin alfa (PSK-a) kullanımının etkilerini değerlendirmişlerdir. Ek olarak, NPB99 + 10F indüksiyon ortamında yumurtalık ko-kültürünün katkısı araştırılmıştır. PSK-a; 10^{-7} M'a kadar olan konsantrasyon aralığında, buğday ve tritikale çeşitlerinde en yüksek dozda kontrole kıyasla daha fazla embriyo benzeri yapı ve yeşil bitki oluşturmuştur. Ayrıca buğday çeşitlerinde albinizmi en az orana indirmiş, ancak tritikalede azaltmamıştır. İlginç bir şekilde, 10^{-7} M PSK-a, yumurtalıkların ko-kültürü ile birlikte çok sayıda embriyo ve yeşil bitkinin oluşumunu desteklemiştir. Son olarak, indüksiyon ortamı osmolalitesi üzerine yaptıkları çalışmada (2014b), buğday ve tritikalenin izole edilmiş mikrosporları mannitol kullanılarak çeşitli osmolalitelere (300-500 mOsm kg^{-1}) tabi tutulmuştur. Her iki türde de, maksimum embriyo benzeri yapı ve yeşil bitki sayısı, indüksiyon ortamı 9.1 g L^{-1} mannitol ile desteklendiğinde 350 mOsm kg^{-1} 'den elde edilmiştir. Daha yüksek osmolalitelere mikrospor yanıtında keskin bir düşüş gözlenmiştir.

Yapılan farklı çalışmalardaki bu gelişmelere rağmen buğdayda embriyo düşüklüğü, yüksek albino bitki oluşum oranları, düşük oranda yeşil bitki üretimi ve genotip bağımlılığı gibi bazı zorluklar devam etmektedir. Araştırmacılar bu sorunları çözebilmek için çeşitli yaklaşımlar geliştirmeye devam etmiştir. Sinha vd. (2015) dimetil tirozin (DMT) konjuge kısa peptitlerin mikrospor embriyogenesisine katkısını araştırmıştır. Canlı mikrospor sayısının SS-31 ve kaspaz-3 inhibitörü (Ac-DEVD-CHO) varlığında önemli ölçüde daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. Özellikle, tritikalede rejenere olan toplam yeşil bitki sayısı SS-02 ile %42 ve SS-31 ile %55 oranında artmıştır. Ayrıca, SS-31 ve Ac-DEVD-CHO varlığında daha düşük kaspaz-3 benzeri aktiviteler gözlenmiş ve hücre içi reaktif oksijen türleri (ROS) SS-31 ile azaltılmıştır. Bu sonuçlar, SS-31'in ROS ve kaspaz-3 benzeri aktiviteyi azaltarak mikrospor hücre ölümünü azalttığını ortaya koymuştur.

Başka bir çalışmada, Sinha vd. (2016), buğday mikrospor kültüründe anti-apoptotik rekombinant insan B-hücreli lenfoma-2 (Bcl-2421) ve kaspaz-3-inhibitörü (Ac-DEVD-CHO) kullanmıştır. Bcl-2421 ve Ac-DEVD-CHO içeren indüksiyon ortamı, önemli ölçüde daha yüksek sayıda canlı mikrospor, embriyo benzeri yapı ve toplam yeşil bitki vermiştir. Elde ettikleri sonuçlar Bcl-2421 ve Ac-DEVD-CHO'nun hücreleri farklı yollarla ölümden koruduğunu göstermiştir. Bcl-2421 hidroksil radikallerini (HO-) detoksifiye ederken, kaspaz-3 benzeri aktiviteyi baskılamakta, Ac-DEVD-CHO ise kaspaz benzeri aktiviteyi modüle ederek hücre ölüm yollarını inhibe etmektedir.

Jiang vd. (2017) trikostatin kullanımını araştırmış ve hem ticari çeşitlerde hem de F1 hibritlerinde DH üretiminin verimliliğinde önemli bir artış gözlemlemiştir. MH08 genotipinde ortalama 173 embriyoid değeri ve Andrew genotipinde ortalama 28 yeşil bitki verimi bildirmişlerdir.

Wang vd. (2019), hem yazlık hem de kışlık buğday genotipleri için verimli ve geniş çapta uyarlanabilir bir mikrospor kültürü metodolojisi geliştirmeyi amaçlamıştır. Mevcut buğday mikrospor kültürü yöntemlerinin, özellikle kış genotipleri için rutin uygulama için yetersiz kaldığını kabul etmişlerdir. Çalışmaları, mikrospor embriyogenesis frekansını artırmaya ve mikrospondan türetilen embriyoların verimli yeşil bitkilere dönüşümünü iyileştirmeye odaklanmıştır. Mikrospor embriyogenesis sürecinin tüm aşamalarında çok sayıda faktörün test edildiği sistematik bir değerlendirme yapılmıştır. Sonuçlar birkaç önemli bulgunun altını çizmiştir: Optimum soğuk ön işlem

süreleri kışlık buğday genotipleri için 28 gün ve yazlık genotipler için 21 gün olarak belirlenmiştir. Yüksek sıklıkta embriyojenik mikrospor içeren mikrospor süspansiyonları %23 maltoz gradyanı kullanılarak toplanmış ve ardından mannitol içeren bir çözelti ile peletlenmiştir. Trikostatin A (TSA) uygulaması hem embriyogenesi hem de yeşil bitki rejenerasyonunu artırmıştır. Scriptaid, BIX-01294 ve sodyum bütirat gibi diğer epigenetik kimyasallar da değerlendirilmiştir. Scriptaid embriyogenesi artırırken, rejenere edilen bitkiciklerde anormal sürgün ve kök gelişimine yol açmıştır.

Tüm bu çalışmalar, buğdayda mikrospor embriyogenesi ve DH bitki üretimindeki zorlukların üstesinden gelmek için devam eden çabaları göstermektedir. Araştırmacılar, farklı materyaller ve yaklaşımlar kullanarak yeşil bitkilerin canlılığını ve rejenerasyonunu artırmayı ve sonuçta DH üretiminin verimliliğini ve başarı oranlarını iyileştirmeyi amaçlamaktadır.

Değişen başarı oranlarına rağmen mikrospor kültürlerindeki çalışmalar, bitki biyoteknolojisinin diğer uygulamaları ve özellikle transgenik bitkilerin yetiştirilmesi alanında da önemli ilerlemelerin kaydedilmesini sağlamıştır.

2.1.3. Buğdayda shed-mikrospor kültürü çalışmaları

Nicotiana tabaccum için geliştirilen shed-mikrospor kültürü yönteminde inokulasyondan kısa süre sonra anterlerin doğal olarak açılması ve mikrosporların sıvı ortama dağılarak orada bağımsız şekilde gelişim avantajından yararlanılır. Bu teknikte, anterler petri kaplarındaki sıvı ortamın sıg yüzeylerinde gezdirilir, mikrosporların sıvı ortama dökülmesine ve büyümeye devam etmesine izin verilir ve gerekiyorsa anterler ortamdaki çıkartılır (Sunderland ve Roberts. 1977). Bu yöntem daha sonra 1982 yılında Wei tarafından buğday için uyarlanmıştır. Sıvı ortamda kültüre alınan *T. aestivum* anterlerinden 4-8 gün arasında dökülen mikrosporların kallus oluşturduğu belirtilmiştir. Katı ortamdaki anter kültürleriyle karşılaştırıldığında, sıvı ortamdaki mikrospor kültürleri anter başına yaklaşık altı kat daha fazla kallus oluşturmuştur. Yine de, mikrospor kültüründen elde edilen kalluslar, katı ortamdaki anter kültürlerinden elde edilenlere göre sürgünleri rejenere etmede daha az etkili bulunmuştur. Yeşil sürgünlerin albino sürgünlere göre oranı anter kültürleri için kabaca 1:1 iken mikrospor kültürleri için çok daha düşüktür. Shed mikrospor kültürü, karmaşık izolasyon işlemlerinden ve

mikrosporların zararlanma riskinin olmaması nedeniyle mekanik olarak izole edilen mikrospor kültürüne göre önemli bir avantaja sahiptir (Ziauddin vd. 1990).

Yukarıda da belirtildiği gibi buğdayda ilk shed mikrospor kültürü Wei (1982) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada beş buğday çeşidi kullanmış ve bunların başakları mikrosporlar orta tek çekirdekli aşamadayken toplanmıştır. Bu başaklar sekiz gün boyunca + 4-5 °C'de soğuk muamelesine tabi tutulmuştur. Wei üç indüksiyon ortamını test etmiştir: Patates-2, N6 ve C1 ortamları. Ortamların hepsi %5 sukroz, 2-3 mg/L 2,4-D, 800 mg/L glutamin, 100 mg/L serin ve 5000 mg/L myo-inositol içermiş ve pH 5.8'e ayarlanmıştır. Oluşan kalluslar 20 gün sonra indüksiyon ortamına benzer, ancak 250 mg/L laktalbumin hidrolizat ve 0.3-0.5 mg/L kinetin içeren büyüme ortamına alınmıştır. Rejenerasyon için 0.3 mg/L IAA ve 1 mg/L kinetin içeren MS ortamı kullanılmıştır. Wei, C1 ortamının Patates-2 veya N6 ortamından daha fazla kallus ürettiğini ve genotipler arasında önemli farklılıklar olduğunu belirtmiştir. Kalluslardan hem yeşil hem de albino sürgünler üretilmiş, ancak mikrospor kültürleri katı anter kültürlerine göre anter başına yaklaşık altı kat daha fazla kallus vermiştir. Bununla birlikte, yeşil/albino sürgün oranı anter kültürleri için yaklaşık 1:1 iken, mikrospor kültürleri için çok daha düşük olmuştur.

Datta ve Wenzel. (1987), yılında bir Fransız ve beş Çin yazlık buğday çeşidinin yanı sıra yedi F1 yazlık buğday melezi ile buğday androgenesi üzerine denemeler gerçekleştirmiştir. Mikrosporların çoğu orta tek çekirdekli aşamadayken başaklar toplanmış ve 4-20 gün boyunca + 5°C'de soğuk stresine maruz bırakılıp, üç farklı besin ortamında test edilmiştir: Patates-2 (P2), N6 ve Murashige Skoog (MS) ortamları. P2 iyi sonuç vermezken modifiye edilmiş MS ve N6 ortamları benzer ve başarılı sonuçlar göstermiştir. Çalışmada birkaç buğday ortamı modifiye edilmiştir. WM1; N6 tuzları, %6 sukroz, %0,5 myo-inositol, %0,5 glukoz ve 160 mg/L glutaminden oluşurken, WM2; %10 Fikollü WM1 ortamı olup, WM4 ise 1, %0,1 kazein hidrolizat ve 2,28 µM zeatin içeren WM1 ortamından meydana getirilmiştir. Mikrospor bölünmesini teşvik etmek için sukroz (%3-9) ve 2,4-D (4.5-22.5 µM) konsantrasyonlarını değiştirmişlerdir. Rejenerasyon ortamları (R3 ve R7) da sukroz, myo-inositol ve agar eklenmiş WM1'den oluşturulmuştur. Datta ve Wenzel, 6-8 gün boyunca soğuk muamelenin polen bölünmesini ve embriyoid oluşumunu uyardığını bildirmiştir. Embriyojenik mikrokallus oluşumu için 2,4-D'nin varlığı gerekli bulunmuştur. Daha yüksek 2,4-D

konsantrasyonlarının Fikoll ile birlikte embriyoid indüksiyonunu teşvik ettiği çalışmada 106 embriyodan 5 yeşil bitki ve 72 albino bitki elde edimiştir.

2.2. Buğdayda somatik embriyogenesis çalışmaları

Somatik embriyogenesis, somatik hücrelerden somatik embriyoların üretildiği doğal bir fenomendir. Bu yöntem, bitki çoğalması için en etkili morfojenik yol olarak kabul edilir. Bu yöntem, genetik transformasyon çalışmaları ve çeşitlerin hızlandırılmış gelişimi için gerekli olan bitki çoğaltımı ve rejenerasyonu için etkili bir araç sunmaktadır. (Ramírez-Mosqueda, 2022). Somatik embriyogenesis doğrudan veya dolaylı yollarla gerçekleşebilir. Direkt somatik embriyogenesis kallus oluşum aşamasını içermezken, indirekt somatik embriyogenesis somatik embriyo gelişiminden önce kallus oluşumunu içermektedir (Ahmadpour vd. 2017). Buğday somatik embriyogenesisi, buğday ıslahı için önemli bir yöntem olarak bitki biyoteknolojisinde ve genetik transformasyon çalışmalarında çok sayıda yarar sağlamaktadır (Adero vd. 2019). Somatik embriyogenesis, gametik füzyon olmadan somatik hücrelerden embriyo benzeri yapılar üretmeyi sağlar ve bu süreç, düşük kimeraz frekansı, yüksek sayıda rejenerant ve sınırlı somaklonal varyasyon ile sonuçlanır (Kahriz ve Kahriz. 2017).

1970 yılında Norstog, kinetin içeren bir ortamda kültüre alınan olgunlaşmamış arpa embriyolarının epiblastından atipik embriyoidlerin geliştiğini bildirmiştir. Bu çalışma bir tahıl bitkisinde embriyoid oluşumunun ilk raporu olmuştur. Bundan sonra, embriyoid oluşumu buğday (Magnusson ve Bornman, 1985; Ozias-Akins ve Vasil. 1983; Thomas vd. 1977; Vasil ve Vasil. 1981) da dahil olmak üzere diğer türler üzerinde rapor edilmiştir. Birçok araştırmacı buğdayın kök (Dudits vd. 1975), olgun yaprak (Wernicke ve Milkovits. 1987) , olgun tohum (Ozias-Akins ve Vasil. 1983), olgun embriyo Aadel vd. 2016; Filippov vd. 2006; Ekom vd. 2013b), olgun embriyo parçaları (Delporte, Mostade, vd., 2001a), olgunlaşmamış embriyo (Aadel vd. 2016b; le Roux vd. 2016; Parmar vd. 2012) olgun skutellum (Yadav vd. 2020), olgun olmayan skutellum (He ve Lazzeri. 2001; Yadav vd. 2020), infloresens (He ve Lazzeri. 2001; Kavas vd. 2008) ve genç yaprak (Ahuja vd. 1982; Chugh ve Khurana. 2003; Kopertekh ve Stribnaya. 2003; Yu vd. 2012) gibi çeşitli eksplantlarının totipotensisini araştırmıştır. Bunlar arasından olgunlaşmamış embriyoların rejenerasyon için en verimli eksplant olduğu belirlenmiştir (le Roux vd. 2016; Parmar vd. 2012). Ancak bu eksplantların genotipe bağımlı (Zhang

vd. 2015) ve sadece kısa bir süre içinde kültüre alınabileceği (Filippov vd. 2006) bildirilmiş olup, bununla birlikte olgunlaşmamış eksplantlardan (embriyo, skutellum ve infloresens) elde edilen embriyojenik kallusların çoklu bitkicik üretme potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir.

Purnhauser vd. (1987), olgunlaşmamış buğday embriyolarını (antesiden 11-15 gün sonra) eksplant olarak kullanmış ve 1 mg/L tiamin-HCl, 100 mg/L myo-inositol, %2 sukroz, %0.7 Bakto-Agar ve 1 mg/L 2,4-D içeren modifiye MS ortamında kültüre almışlardır. İlk kallus oluşumundan sonra, kallus büyümesini sürdürmek için kalluslar azaltılmış 2,4-D konsantrasyonu (0.5 mg/L) ile aynı ortama aktarılmıştır. Sürgün ve kök rejenerasyonu için kalluslar 2,4-D, myo-inositol ve tiamin-HCl içermeyen MS ortamına taşınmıştır. Ayrıca, 5-50 mg/L konsantrasyonlarda AgNO₃ (gümüş nitrat) eklenmiş ve bu da sürgün rejenerasyonunu önemli ölçüde desteklemiştir. AgNO₃'ün dahil edilmesinin, etilen kaynaklı inhibisyonu azaltarak sürgün rejenerasyonunu önemli ölçüde artırdığı ifade edilmiştir.

Benkirane vd. (2000), Fas'ta yetiştirilen 10 makarnalık buğday çeşidini kullanarak yaptıkları somatik embriyogenesis çalışmasında, eksplant olarak olgunlaşmamış infloresans ve koleoptilleri kullanmışlardır. İndüksiyon ortamı olarak çeşitli konsantrasyonlarda 2,4-D (2.3, 4.5, 6.8, 9, 11.3 µM), 8 g/L agar ve 30 g/L sukroz içeren MS ortamı kullanılmış ve bunların pH sı 5.8'e ayarlanmıştır. Rejenerasyon içinse 0.9 µM 2,4-D ve 0.5 µM 2iP içeren MS ortamı kullanılmıştır. Sürgünler daha sonra 2-4 hafta boyunca büyüme düzenleyicileri olmadan ½ MS ortamına, ardından 5.5 µM IAA ve 3 µM GA3 içeren MS ortamına aktarılmıştır. Her iki eksplant türü hem embriyojenik hem de embriyojenik olmayan kalluslar üretmiştir. Embriyojenik kalluslarda somatik embriyolar gelişerek normal, verimli bitkiler ortaya çıkmıştır. İnfloresans parçaları, 6.8 µM 2,4-D içeren ortamda en yüksek embriyojenik kallus (çoğu çeşit için %100) ve rejenerasyon ('Massa' ve 'Isly' için %100) frekanslarını oluşturmuştur. Koleoptil eksplantları daha düşük embriyogenesis ve rejenerasyon frekanslarına sahipken, 1 mm'lik parçalar 2-4 mm'lik segmentlerden daha iyi performans göstermiştir. Çalışmada 2,4-D konsantrasyonu kallus indüksiyonunu önemli ölçüde etkilememiş, ancak 9 µM rejenerasyon için optimal bulunmuştur. Ayrıca, çalışmada her iki eksplant türü için kallus indüksiyonu ve bitki rejenerasyonu üzerinde genotip etkisi gözlemlenmiştir.

He vd. (2001a), makarnalık buğdayın dört genotipinden olgunlaşmamış skutellum ve infloresans eksplantları için kültür koşullarını optimize etmiştir. Skutellum eksplantları, infloresans eksplantlarına kıyasla daha yüksek embriyogenesis ve bitki rejenerasyonu frekansları göstermiştir. Pikloram her iki eksplanttan da bitki rejenerasyonunu önemli ölçüde artırmıştır. Üç haftalık iki aşamalı zeatin içeren rejenerasyon ortamındaki kültürlerde rejenerasyon frekansında %20-30 artış görülmüştür. Büyüme ortamına 1 mg/L 6-BAP eklenmesi sürgün kardeşlenmesini artırmıştır. Optimize edilmiş koşullar; skutellum kültürleri için %97-100 (2 mg/L pikloram ile) ve infloresans kültürleri için %45-80 (4 mg/L pikloram ile) rejenerasyon sağlamış, skutellum başına ortalama 34 bitki ve infloresans eksplant başına ortalama 16 bitki elde edilmiştir. Bu çalışma, skutellum eksplantlarının etkinliğini ve makarnalık buğdayda rejenerasyonu artırmada pikloram ve zeatinin etkisini ortaya koymuştur.

Delporte vd. (2001), embriyojenik kallus oluşturmak için kışlık buğday (Odeon çeşidi) ve yazlık buğdaydan (Minaret çeşidi) olgun embriyo parçaları kullanmışlardır. Embriyolar 500 µm'lik parçalara ayrılmış ve 10 µM 2,4-D içeren katı ortamda kültüre alınmıştır. Aktif hücre bölünmesi 24 saat içinde başlamış, 3 gün içinde 100 parçalanmış embriyodan %90 kallus indüksiyon oranı elde edilirken, proembriyolar 8. günde ortaya çıkmıştır. En yüksek embriyojenik kallus indüksiyon oranı (%47) 3-4 hafta sonra 2,4-D kaldırıldığında elde edilmiştir. İki rejenerasyon yöntemi karşılaştırılmış ve toplam 513 bitkicik üretilmiştir. Optimal protokol 100 embriyo başına 25-30 bitki üreterek bu yöntemi transformasyon uygulamaları için uygun hale getirmiştir.

Milczarek ve Zimny (2001), olgunlaşmamış embriyolar kullanarak üç azot tuzunun (NH_4NO_3 , KNO_3 ve NH_4Cl) buğday *in vitro* kültürleri üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Hem NO_3^- hem de NH_4^+ iyonlarının embriyojenik kallus çoğalması ve somatik embriyoların gelişimi için gerekli olduğu bulunmuştur. İnorganik azot kaynağı olarak tek başına NH_4NO_3 in somatik embriyo oluşumunu indüklemek için yeterli olduğu bildirilmiştir.

Mahalakshmi vd. (2003), 2,4-D ile muamele edilmiş buğday yaprağı alt segmentlerinde doğrudan somatik embriyogenesisi araştırmışlardır. Yaprak dibi parçalarına 24 saat boyunca 10 µM 2,4-D uygulandığında ve MS besin ortamında 2 haftadan daha kısa bir süre kültürlendiğinde direkt somatik embriyolar gelişmeye başlamıştır. Bu tepkinin oksine özel bir tepki olarak ve genotipten bağımsız olarak

gerçekleştiği belirtilmiştir. Yaprak segmentlerine 1 dakika boyunca 50 μ M 2,4-D'nin vakumla infiltrasyonu da embriyojenik yanıtı etkili bir şekilde indüklemiştir. İndirekt yöntemlerle karşılaştırıldığında, bu doğrudan embriyogenesis sistemi, embriyo indüksiyonu için gereken süreyi (15-20 gün kadar) önemli ölçüde azaltmış ve dediferansiyasyon sırasında ikincil değişiklikleri en aza indirmiştir.

Chugh vd. (2003), buğdayda somatik embriyogenesis ve genetik transformasyon için yaprak dip kısımlarını kullanmışlardır. *Triticum aestivum* var. CPAN1676 ve *Triticum dicoccum* var. DDK1001'in 5 günlük bitkilerinden alınan bazal segmentler kallus ortamında kültüre edilmiş ve ardından oksin içermeyen ortamda rejenerasyon gerçekleştirilmiştir. Somatik embriyogenesis 2 hafta içinde gözlenmiş ve yüksek rejenerasyon oranlarına ulaşılmıştır (CPAN1676 ve DDK1001 için sırasıyla %68 ve %82). Embriyojenik kallus, partikül bombardımanı yoluyla genetik transformasyon için kullanılmış ve higromisin direnci elde edilmiştir. CPAN1676, PBW343 ve DDK1001'de sırasıyla %8.6, %7.5 ve %4.9'luk transformasyon verimlilikleri elde edilmiştir. Southern Blot hibridizasyonu, T0 bitkilerinde hptII transgeninin (higromisin direnci) varlığını teyit etmiştir.

Li vd. (2003), ticari buğday çeşitlerinden izole edilmiş skutellum eksplantlarını kullandıkları somatik embriyogenesis çalışmasında, anthesis sonrası günlerin (DPA), +4°C'de başak depolama günlerinin (DSS) ve sukroz konsantrasyonlarının (SC) embriyogenesis etkinliği üzerindeki etkileri incelenmiştir. Yapılan ilk denemede, çeşitli DPA'larda toplanan ve farklı sürelerde saklanan başaklardan elde edilen skutellum, 9.96 mM 2,4-D ve 110 mg/L kasamino asit içeren indüksiyon ortamında kültüre alınmıştır. DPA ve DSS etkileşimi, olgun embriyo üreten skutellum yüzdesini önemli ölçüde etkilerken, DPA tek başına skutellum başına embriyo sayısını etkilemiştir. İkinci denemede, 12 DPA başaklarından elde edilen skutellum farklı süreler boyunca depolanmış ve değişen sukroz konsantrasyonlarına sahip ortamda kültüre alınmıştır. DSS ve SC arasındaki etkileşim hem olgun embriyo üreten skutellum yüzdesini hem de skutellum başına embriyo sayısını önemli ölçüde etkilemiştir. Optimal kombinasyonlar, en yüksek embriyogenesis verimliliğini gösteren 12 DPA / 17 DSS / 3% SC, 12 DPA / 18 DSS / 3% SC ve 12 DPA / 19 DSS / 2% SC'yi içermiştir.

Filippov vd. (2006), Rus yazlık ve kışlık buğday genotiplerinin olgun embriyolarından embriyogenesisi ve bitki rejenerasyonunu etkileyen faktörlerden farklı

oksinler olarak 2,4-D, 2,4,5-T ve Dicamba'nın etkilerini araştırmışlardır. Dicamba %21.8 ile %38.3 arasında değişen oranlarda embriyojenik kallus oluşturarak en etkili oksin olarak bulunmuştur. Maksimum embriyojenik kallus oluşumu ve yüksek sayıda rejenere bitki 12 mg/L Dicamba'dan elde edilmiştir. Dicamba'ya uygulama süresi (7 ila 28 gün) somatik embriyogenesis etkinliğini önemli ölçüde etkilemiş, daha uzun uygulama süreleri artan embriyogenesis oranları ve rejenere bitki sayısı ile ilişkilendirilmiştir. Dicamba ile kallus indüksiyon ortamına oksinlerin (IAA, IBA ve NAA) eklenmesi embriyojenik kallus oluşum oranını artırmıştır. En iyi somatik embriyogenesis oranı (%60) Dicamba ile birlikte 0.5 mg/L IAA ilavesinden elde edilmiştir.

Mahalakshmi vd. (2007), daha önce 2003 yılında yaptıkları çalışmaları temel alarak buğday yaprak diplerini kullanmışlardır. Araştırmada, buğday yaprak diplerinin 10 μ M 2,4-D ile bir gün boyunca kültürlenmesinin somatik embriyogenezi tetiklediğini göstermişlerdir. Yaprak diplerinin 2,4-D uygulamasından önce kalsiyum şelatörü EGTA (Ethylene Glycol Tetraacetic Acid) ile muamele edilmesi somatik embriyogenesisi engellediğinden, bu indüksiyonun kalsiyum aracılı olduğu bulunmuştur. İnhibisyon kalsiyum iyonları ile tersine çevrilebilirken magnezyum veya çinko gibi diğer iki değerlikli katyonlar ile tersine çevrilememiştir. Ayrıca, *Triticum aestivum* kalmodulin bağlayıcı protein kinaz, kalsiyum bağımlı protein kinaz ve somatik embriyogenesisde kalsiyum için spesifik bir role işaret eden varsayılan bir kalsiyum bağlayıcı protein dahil olmak üzere kalsiyumla düzenlenen üç genin ekspresyonunu analiz etmişlerdir. Kalsiyum iyonoforu A23187'nin tek başına ya da 2,4-D ile birlikte uygulanması somatik embriyogenesisi tetikleyerek kalsiyumun özgüllüğünü doğrulamıştır. Kalsiyum kanal blokerleri (verapamil ve nifedipin), kalsiyum antagonisti lantanum ve kalmodulin inhibitörleri (klorpromazin ve flupenazin) ile 2,4-D uygulamasından önce muamele edildiğinde somatik embriyogenesisin inhibisyona uğradığı bildirilmiştir.

Yu vd. (2012), yaprak dokularını kullanarak *in vitro* rejenerasyon sistemini araştırmışlardır. Rejenere edilmiş bitkiciklerin 4 cm lik yapraklarından alınan 2 mm'lik bazal parçalar en iyi kallus indüksiyonunu sağlamıştır. Kallus indüksiyonu için en uygun ortam 2 mg/L 2,4-D ve 1 mg/L NAA ile desteklenmiş MS ortamı olmuş ve %87.2 kallus indüksiyon oranı elde edilmiştir. Farklılaştırma için, en iyi sonuçlar 10 mg/L gümüş nitrat ve 1 mg/L 2,3,5-triiodobenzoik asit ile desteklenmiş MS bazal ortamı ile elde edilmiş ve test edilen buğday hatları için %33.7 rejenerasyon oranı elde edilmiştir. Bu çalışma, *in*

vitro rejenere bitkiciklerden elde edilen yaprak bazal parçalarının buğday rejenerasyonu için kullanılabileceğini gösteren ilk çalışma olması bakımından önemlidir. Bu tekrarlayan rejenerasyon sistemi, *in vitro* rejenere buğday ve diğer tahıl ürünlerinin yaprak materyalinden başlayarak kloroplast dönüşümünü ve bitki rejenerasyon sistemlerini kolaylaştırabilir.

Parmar vd. (2012a), olgun embriyoları kullanarak 10 ticari Hint ekmeklik buğday çeşidi için tekrarlanabilir ve nispeten genotipten bağımsız bir *in vitro* bitki rejenerasyon protokolü geliştirmiştir. Kallus indüksiyonu ve bitki rejenerasyonu üzerindeki etkileri için modifiye MS ortamında üç farklı oksin ve beş büyüme düzenleyici kombinasyonunu test etmişlerdir. Hormonsuz ortamda 2 mg/L 2,4-D ile indüklenen kallus, eksplant başına ortalama 7.5 sürgün ile %86 rejenerasyon frekansı göstermiştir. Rejenerasyon sıklığı, tidiazuron (TDZ) ve 2,4-D kombinasyonu ile %97'ye ve eksplant başına 19 sürgüne yükselmiştir. Protokol, bitki rejenerasyonunu iyileştirmek için erken kallus aşamasında rejenere olabilen kallilerin rejenere olamayan yapılardan fiziksel olarak izole edilmesi gerektiğini ortaya koymuştur.

Roux vd. (2016), altı Güney Afrika ekmeklik buğday genotipi (*Triticum aestivum* L.) için etkili *in vitro* rejenerasyon protokolleri geliştirmiş ve rejenerasyon verimliliğinde %0 ila %36.5 arasında değişim göstermiştir. En yüksek ve en düşük verimlilikler sırasıyla Gamtoos ve Tugela genotiplerinde gözlenmiştir. Anthesis'ten 12 gün sonra izole edilen olgunlaşmamış embriyolar, pikloram ve/veya 2,4-D kullanılarak 4 ila 6 gün içinde embriyojenik kalluslar oluşturmuştur. Adventif sürgünler, BAP ve zeatin varlığında 3 ila 4 haftalık kalluslardan çıkmıştır. Maltoz, MS vitamin karışımı ve 50 µM gümüş nitrat kullanımı rejenerasyon yeteneklerini geliştirmiştir. İn vitro bitkiciklerin köklenmesi, BGD içermeyen MS veya yarı kuvvetli MS ortamında sağlanmıştır.

Aadel vd. (2016), olgunlaşmamış ve olgun embriyoları eksplant olarak kullanarak ortamların, çeşitlerin ve bunların etkileşimlerinin ekmeklik buğdayda kallus indüksiyonu ve bitki rejenerasyonu üzerindeki etkilerini incelemiştir. Dört Fas ekmeklik buğday çeşidi ('Achtar', 'Amal', 'Mehdia' ve 'Rajae') dört ortamda (M1 - M4) yetiştirilmiştir. Her iki embriyo tipinde de kallus indüksiyonu için çeşit, ortam ve bunların etkileşiminin önemli etkileri gözlenmiştir. Tüm ortamlar, tüm çeşitlerde embriyojenik kallus oluşumunu indüklemiştir. 2 mg/L pikloram içeren M2 ortamı en yüksek bitki rejenerasyon oranlarını vermiştir. Olgunlaşmamış embriyolardan kallus başına 1.4 bitkicik (%21.9) ve olgun

embriyolardan kallus başına 0.84 bitkicik (%20.2) elde edilirken, M2 ortamı tüm çeşitler için en uygun ortam olarak belirlenmiştir.

Aydın vd. (2016), olgun embriyolar kullanarak poliaminlerin buğdayda somatik embriyogenez üzerindeki etkisini araştırmıştır. Kallus indüksiyon ortamı, 12 mg/L dikamba, 0.5 mg/L IAA, 20 g/L sukroz, 7 g/L agar ve 1.95 g/L MES ile desteklenmiş MS bazal tuzları ve vitaminlerinden oluşturulmuştur. Embriyojenik kallus oluşumu ve olgunlaşması için, ilk oluşan kalluslar üç poliaminin (putresin, spermidin ve spermin) değişen konsantrasyonlarını (0, 0.5, 1.0 mM) içeren MS ortamına aktarılmış ve 14 gün boyunca karanlıkta kültürlenmiştir. Daha sonra embriyojenik kallus oranı hesaplanmıştır. Ardından, kalluslar bitki rejenerasyonu için 0.5 mg/L TDZ içeren MS ortamına taşınmıştır. Çalışmada endosperm destekli olgun embriyo kültüründe %100 kallus oluşum oranı bulunmuştur. Embriyojenik kallus oluşumu, poliaminlerin türüne ve konsantrasyonuna bağlı olarak %90 ila %100 arasında değişmiştir. Putresin, 1 mM konsantrasyonda en yüksek ortalama embriyojenik kallus oranını (%78.3) ve rejenerasyon verimliliğini (eksplant başına 2.5 bitki) sağlamıştır. Spermidin ve spermin ise daha düşük ortalama embriyojenik kallus oranları (sırasıyla %70.3 ve %58.9) ve daha düşük rejenerasyon verimliliği (eksplant başına sırasıyla 1.7 ve 1.6 bitki) göstermiştir.

Birla vd. (2017), yılında yaptıkları çalışmada, olgun embriyolar kullanarak beş Hint buğday çeşidinde *in vitro* rejenerasyonu etkileyen faktörleri araştırmışlardır. Erken çimlenmeyi azaltırken, embriyojenik kallus indüksiyonunu artırmak için zeatin konsantrasyonu ve dikamba ile modifiye edilmiş MS bazal ortamı gibi koşulları optimize etmişlerdir. Maltoz; kallus oluşumu ve rejenerasyonu için karbon kaynakları arasında en etkili olduğunu kanıtlamıştır. Jelleştirici maddeler rejenerasyon verimliliği üzerinde önemli bir etki göstermemiştir. Dikamba ile modifiye edilmiş MS bazal ortamı erken çimlenmeyi etkili bir şekilde azaltmış ve embriyojenik kallus oluşumunu indüklemiştir. Embriyojenik kallusların yenilenemeyen yapılardan erken çıkarılması bitki rejenerasyonunu artırmıştır. Zeatin (1 mg/L) ve dikamba (0.1 mg/L) içeren optimum ortam, kallus başına 8-9 sürgün üreterek en yüksek rejenerasyon frekansını (%98) oluşturmuştur. Çalışma, C-306 ve HD-2967'yi genetik transformasyon çalışmaları için uygun yüksek rejeneratif çeşitler olarak tanımlamış ve ıslah çalışmaları için değerli bilgiler sunmuştur.

Malik vd. (2020), tarafından Hexaploid ekmeklik buğdayın (*T. aestivum* L.) *in vitro* rejenerasyonu üzerine yapılan çalışmada, *in vitro* rejenerasyonda oratay çıkan zorlukların transformasyon ve fonksiyonel genomikteki ilerlemeleri engellediği bildirilmiştir. Altı önemli buğday çeşidinin kullanıldığı çalışmada, olgunlaşmamış ve olgun skutellum eksplantları kullanılarak karşılaştırmalı rejenerasyonları araştırılmıştır. HD-2967, PBW-343, WH-1105, PBW-550, DBW-17 ve WL-711 genotiplerinin 2,4-D ile desteklenmiş MS ortamında kültüre alınan olgunlaşmamış skutellumları, tüm çeşitlerde %100 kallus indüksiyonu göstermiş ve kültürlerin %90'ında kallus başına 15 sürgüne kadar rejenerasyon sağlamıştır. Buna karşılık, olgun skutellumlar %80 kallus indüksiyonu göstermiş ve kültürlerin %67'sinde maksimum 5 sürgün üretmiştir. Çalışma, olgunlaşmamış skutellumların kallus indüksiyonu ve sürgün rejenerasyonu için olgun olanlara göre üstün duyarlılığını göstermiştir. Sürgün rejenerasyonu için optimum koşullar; NH₄NO₃, zeatin, dicamba, AgNO₃, CuSO₄ ve sukroz ile zenginleştirilmiş modifiye MS ortamında kültüre alınan eksplantların ışık koşulları altında kültürü olarak belirtilmiştir. Çalışılan çeşitler arasında, HD-2967 en yüksek rejenerasyon potansiyelini göstererek, buğday çeşitlerini geliştirmeyi amaçlayan daha ileri genetik transformasyon çalışmaları için uygunluğunu ortaya koymuştur.

Sonuç olarak, bu bölümde buğday *in vitro* androgenesi ve somatik embriyogenesi hakkındaki mevcut bilgiler kapsamlı bir şekilde değerlendirilmeye çalışılmıştır. Bu ileri teknikler, buğday ıslahını hızlandırmak ve ticari çeşitler geliştirmek için önemli bir umut vermektedir. Temel çıkarımlarda belirtildiği gibi; genotip, eksplant seçimi, kültür ortamı ve çevresel koşullar bu süreçleri etkileyen kritik faktörlerdir. Gelecekteki araştırmalar; daha fazla buğday genotipi için protokolleri optimize etmeye, temel moleküler mekanizmaları aydınlatmaya ve bu teknikleri genetik transformasyon ve genomik analiz gibi gelişmiş araçlarla entegre etmeye odaklanmalıdır. Araştırmacılar bu alanları ele alarak *in vitro* androgenesi ve somatik embriyogenesinin buğday ıslahını ilerletme potansiyelini tam olarak ortaya çıkarabilirler

3. MATERYAL VE METOT

Bu araştırma, 2021-2024 yılları arasında Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Seralarında ve Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Bitki Doku Kültürü Laboratuvarında yürütülmüştür. Araştırma temel olarak buğdayda androgenesis çalışmaları ve somatik embriyogenesis çalışmaları olmak üzere iki ana gruptan oluşmaktadır. Bunların materyal ve metodları aşağıda belirtilmiştir:

3.1. Androgenesis çalışmaları

Androgenesis çalışmaları anter kültüründe yapılan ön denemelerle başlamış olup, bunlar 1.grup androgenesis denemeleri olarak kabul edilmiştir. Daha sonra 2 yıl boyunca devam eden androgenesis çalışmaları kapsamında 2. ve 3. grup androgenesis denemeleri gerçekleştirilmiş, bu grupların her birisinde hem anter hem de mikrospor kültür denemeleri kurulmuştur. Bu kültürlerde kullanılan materyal ve metodun ayrıntıları aşağıda verilmiştir.

3.1.1. Materyal

3.1.1.1. Bitki materyali

Ön denemeler niteliğindeki 1. grup androgenesis denemelerinde yukarıda belirtildiği gibi sadece anter kültürü denemeleri kurulmuştur. Bu denemelerde bitkisel materyal olarak ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.) tipinde 3 kışlık çeşit kullanılmıştır. Bu çeşitler Altındane, Dariel ve Pehlivan olup (Çizelge 3.1), tohumları sera koşullarına ekilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan buğday genotipleri.

Çalışma Grupları	Çalışmada Kullanılan Buğday Genotipleri			
	Ekmeklik Buğday Çeşitleri		Makarnalık Buğday Çeşitleri	
	Yazlık	Kışlık	Yazlık	Kışlık
I. Grupta (Anter Kültürlerinde) Kullanılan Genotipler		Altındane, Dariel, Pehlivan		
II. Grupta (Anter ve Mikrospor Kültürlerinde) Kullanılan Genotipler	Ceyhan 99, Sagittario	Bayraktar, Esperia	Svevo, Sarıçanak	Eminbey, Kiziltan
III. Grupta (Anter ve Mikrospor Kültürlerinde) Kullanılan Genotipler	Ceyhan 99, Sagittario		Svevo, Sarıçanak	

Anter ve mikrospor kültürü denemelerinin kurulduğu II. grup androgenesis çalışmalarında bitki materyali olarak hem ekmeklik buğday hem de makarnalık buğday (*T. durum* Desf.) tiplerinde 2'şer yazlık ve 2'şer kışlık çeşit olmak üzere toplam 8 genotip kullanılmıştır. Bunlar; makarnalık buğdayda 2 yazlık (Svevo ve Sarıçanak) ve 2 kışlık (Eminbey ve Kiziltan) ile ekmeklik buğdayda 2 yazlık (Ceyhan 99 ve Sagittario) ve 2 kışlık (Bayraktar ve Esperia) standart çeşitler olup (Çizelge 3.1), bunlara ait tohumlar Akdeniz Üniversitesi seralarındaki toprak koşullarına 01.12.2022 tarihinde 5 tekerrürlü ve her tekerrürde 20 bitki yetiştirilecek şekilde ekilmiştir. Vejetasyon süresini uzatarak, daha uzun süre başak toplayabilmek için tohum ekimleri her tekerrür arasında 10 günlük boşluklar olacak şekilde yapılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Akdeniz Üniversitesinde sera koşullarda bitki yetiştiriciliği.

Yine anter ve mikrospor kültürü denemelerinin kurulduğu III. grup androgenesis çalışmalarında, bitkisel materyal olarak II. grup androgenesis çalışmalarında daha başarılı sonuç veren buğday genotiplerinden makarnalık 2 yazlık (Svevo ve Sarıçanak) standart çeşit ile ekmeklik 2 yazlık (Ceyhan 99 ve Sagittario) çeşit olmak üzere toplam 4 genotip (Çizelge 3.1) kullanılmıştır. Yetiştiricilikleri yaz dönemine denk gelen bu çeşitlerin tohumları kontrollü koşullarda bitki geliştirebilmek için 20.08.2023 tarihinde 460x350 mm lik saksılara ekilmiştir. Tohumların çimlenmesinden 2 hafta sonra, üç yapraklı aşamaya ulaşan fidelerin vernalizasyon ihtiyacını karşılamak için saksılar 20 gün boyunca 14 saatlik fotoperiyot ve yaklaşık +4°C'lik bir kontrollü seraya taşınmıştır. Saksılar içerisindeki bitkiler vernalizasyondan sonra seraya transfer edilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Akdeniz Üniversitesi kontrol ve çiftlik sera koşullarında bitki yetiştiriciliği.

3.1.1.2. Androgenesis çalışmalarında kullanılan besin ortamları ve kimyasal

Maddeler

I. grup androgenesis çalışmalarındaki anter kültürü ön denemelerinde 5 indüksiyon ve 1 rejenerasyon ortamı kullanılmıştır. Kullanılan indüksiyon ortamları Çizelge 3.2 de verilmiştir.

Çizelge 3.2. I. grup androgenesis çalışmalarındaki anter kültürlerinde kullanılan indüksiyon ortamları

Ortam No	Ortam Kodu	Ortam Adı	DMSO (%)	Ortam Tipi	pH
1	MS-1	Modifiye MS (Murashige ve Skoog 1962) ortamı	-	Katı	5.9
2	MS-2	Modifiye MS ortamı	-	Katı	5.9
3	CHB-3	Modifiye CHB (Chu vd. 1990) ortamı	-	Sıvı	5.9
4	CHB-3 + MS-2	Katı alt fazı CHB-3 ve sıvı üst fazı MS-2 olan çift fazlı ortam	-	Çift fazlı ortam	5.9
5	CHB-3 + %1 DMSO	%1 DMSO ilave edilmiş CHB-3 ortamı	1	Sıvı	5.9

Çizelge 3.2 nin 5.ortamındaki DMSO (dimethyl sulfoxide) normalde bir organik çözücüdür. Ancak, DMSO, lipid çift tabakasının kalınlığını ve membran akışkanlığını azaltırken membran geçirgenliğini artırır ve androgenesis sürecini etkili bir şekilde geliştirmesi etkisi nedeniyle CHB-3 ortamına %1 oranında ilave edilmiştir (Sharafat vd. 2023).

Yukarıdaki indüksiyon ortamlarında oluşan embriyoidlerin rejenerasyonu için ise R9(Chu vd. 1990) adlı tek bir katı rejenerasyon ortamı kullanılmıştır.

Androgenesis çalışmalarının tümünde kullanılan indüksiyon ve rejenerasyon ortamlarının içerikleri Çizelge 3.3 de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Androgenesis çalışmalarında kullanılan indüksiyon ve rejenerasyon kültür ortamlarının içerikleri (mg/L)

No	Ortam Bileşenleri	İndüksiyon Ortamları			Rejenerasyon Ortamı	
		MS-1	MS-2	CHB-3	R9	B5
MAKRO ELEMENTLER						
1	KNO ₃	1900	1900	1415	1000	2500
2	(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	232	-	134
3	MgSO ₄ . 7H ₂ O	370	370	93	71	121.56
4	KH ₂ PO ₄	170	170	200	300	-
5	CaCl ₂ .2H ₂ O	440	440	83	-	113.23
6	NH ₄ NO ₃	1650	1650	-	1000	-
7	Ca(NO ₃) ₂ .H ₂ O	-	-	-	500	-
8	KCL	-	-	-	65	-
9	NaH ₂ PO ₄	-	-	-	-	130.44
MİKRO ELEMENTLER						
1	MnSO ₄ .5H ₂ O	22.3	22.3	3.75	4.9	10
2	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	8.6	5	2.7	2
3	H ₃ BO ₃	100	100	5	1.6	3
4	KI	0.8	0.8	0.4	0.75	0.75
5	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.025	0.025	0.076	0.025
6	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.25	0.012	0.2	0.25
7	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.025	0.025	0.05	0.025
DEMİR BİLEŞİĞİ						
1	FeNa ₂ EDTA	-	-	40	40	36.7
2	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37.3	37.3	-	-	-
VİTAMİNLER						
1	Nicotinic acid	0.5	0.5	0.5	5	1
2	Biotin	-	-	0.25	-	-
3	Pyridoxine HCl	0.5	0.5	0.5	5	1
4	Thiamine HCl	0.4	0.4	2.5	1	10
5	Myo-inositol	100	100	0.39	-	100
6	Pentathenate	-	-	0.25	-	-
7	Glisin	-	-	1	2	-
8	Glutamin	146	146	1000	500	500
KARBONHİDRAT						
1	Sukroz	40000	30000	-	30000	3000
2	Maltoz	-	-	90000	-	-
BİTKİ GELİŞİM DÜZENLEYİCİSİ						
1	2,4-D	-	-	2	-	-
2	Kinetin	-	-	2	0.5	0.5
3	NAA	4	4	-	0.5	0.5
4	BAP	0.5	0.5	-	1	-
DİĞER KATKI MADDELERİ						
1	AgNO ₃	15	15	-	-	-
2	Aktif karbon	(%0.25)	(%0.25)	-	-	-
3	Gelrite	-	-	-	2800	2800
4	Agar	7000	7000	-	-	-
5	pH	5.9	5.9	5.9	5.9	5.9

Anter ve mikrospor kültürü denemelerinin kurulduğu II. grup androgenesis çalışmalarındaki mikrospor kültürleri için mikrospor izolasyon ortamı olarak FHG ortamının (Hunter 1988) makro elementlerinden oluşan bir izolasyon ortamı (Çizelge 3.4), indüksiyon ortamlarının temel besin ortamı olarak modifiye edilmiş CHB-3 ortamı (Çizelge 3.3) kullanılmıştır.

Çizelge 3.4. II. ve III. grup androgenesis çalışmalarının mikrospor kültürlerinde izolasyon ortamı olarak kullanılan FHG ortamı makro elementleri bileşenleri

N	FHG Ortamı Makro Element Bileşenleri	Miktar (mg/L)
1	KNO ₃	1900
2	MgSO ₄ .7H ₂ O	370
3	KH ₂ PO ₄	170
4	CaCl ₂ .H ₂ O	440
5	NH ₄ NO ₃	165
6	FeNa ₂ EDTA	40

İndüksiyon ortamı olarak II. grup androgenesis çalışmalarında hem anter, hem de mikrospor kültürü denemelerinin her birisinde toplam 18 ortam kullanılmıştır. Bunların temel indüksiyon ortamı yukarıda belirtildiği gibi modifiye edilmiş sıvı CHB-3 (Çizelge 3.3) ortamıdır. Bu CHB-3 ortamına karbonhidrat kaynağı olarak %9 maltoz, BGD olarak 2 mg/L kinetin ve 2 mg/L 2,4-D, 500 mg/L glutamin (embriyo uyartımı ve rejenerasyonunda olumlu etkisi olan bir aminoasit) ve 10 mg/L arabinogalakтан (arabinoz ve galaktoz monosakkaritlerinden oluşan bir biyopolimer) ilave edilmiştir. Daha sonra bu ortama farklı konsantrasyonlarda (0, 100 ve 200 mg/L) timentin (özellikle transformasyon çalışmalarında bitki gelişimini teşvik ettiği bilinen bir antibiyotik) ve aktif karbon (0, 20 ve 40 µm/ml) (adsorbe ve absorbe edici özellikleri ile bir PGR olmasa da bazı durumlarda *in vitro* bitki büyümesini iyileştirici veya düzenleyici etkilere sahip bir organik bileşik) eklenerek 9 farklı indüksiyon ortamı hazırlanmıştır. Bu 9 ortamın pH'sı 1N NaOH veya 1N HCl kullanılarak 6'ya ayarlanmıştır. Yüksek pH'nın olumlu etkilerinin görüldüğü bazı androgenesis çalışmalarından hareketle söz konusu 9 ortamın pH'sının 6.5'a ayarlandığı ikinci bir ortam seti hazırlanarak, toplam 18 indüksiyon

ortamının etkinlikleri hem anter hem de mikrospor kültürlerinde karşılaştırılmıştır (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. II. grup androgenesis çalışmalarının anter ve mikrospor kültürlerinde kullanılan indüksiyon ortamlarının içerikleri

Orta m No	Temel Besin Ortam ı	Kineti n (mg/L)	2,4-D (mg/L)	Glutami n (mg/L)	Arabinogalakta n (mg/L)	Timent n (mg/L)	Aktif karbon (µm/ml)	p H
1	CHB-3*	2	2	500	10	0	0	6
2	CHB-3	2	2	500	10	100	0	6
3	CHB-3	2	2	500	10	100	20	6
4	CHB-3	2	2	500	10	100	40	6
5	CHB-3	2	2	500	10	200	0	6
6	CHB-3	2	2	500	10	200	20	6
7	CHB-3	2	2	500	10	200	40	6
8	CHB-3	2	2	500	10	0	20	6
9	CHB-3	2	2	500	10	0	40	6
10	CHB-3	2	2	500	10	0	0	6.5
11	CHB-3	2	2	500	10	100	0	6.5
12	CHB-3	2	2	500	10	100	20	6.5
13	CHB-3	2	2	500	10	100	40	6.5
14	CHB-3	2	2	500	10	200	0	6.5
15	CHB-3	2	2	500	10	200	20	6.5
16	CHB-3	2	2	500	10	200	40	6.5
17	CHB-3	2	2	500	10	0	2	6.5
18	CHB-3	2	2	500	10	0	40	6.5

* CHB-3 ortamı (Chu vd. 1990)

II. grup çalışmalarının hem anter, hem de mikrospor kültürü denemelerinin yukarıda bahsedilen indüksiyon ortamlarında oluşan embriyoidlerin bitkiye dönüştürülmesi için rejenerasyon ortamı olarak R9 ortamı (Chu vd. 1990) ve B5 ortamı (Gamborg vd. 1968) (Çizelge 3.3) kullanılmıştır.

Yine anter ve mikrospor kültürü denemelerinin kurulduğu III. grup androgenesis çalışmalarındaki mikrospor kültürleri için de mikrospor izolasyon ortamı olarak II. grup

çalışmalarında olduğu gibi FHG makro elementleri (Hunter 1988) indüksiyon ortamlarının temel besin ortamı olarak ise modifiye edilmiş CHB-3 (Chu vd. 1990) ortamının yanı sıra NN (Nitsch ve Nitsch. 1969) ortamı (Çizelge 3.3) kullanılmıştır.

III. grup çalışmalarda hem anter, hem de mikrospor kültürü denemelerinin her birisinde toplam 8 indüksiyon ortamı kullanılmıştır. Bunlardan 6 ortamın temel besin ortamı modifiye edilmiş sıvı CHB-3 ortamı iken, 2 ortamın temel besin ortamı ise NN ortamıdır. Bu ortamlara genel olarak II.grup çalışmalarda olduğu gibi karbonhidrat kaynağı olarak %9 maltoz, BGD olarak 2 mg/L kinetin ve 2 mg/L 2,4-D ve ayrıca bir aminoasit olarak 500 mg/L glutamin ilave edilmiştir. Daha sonra farklı konsantrasyonlarda timentin (0, 75, 150 ve 200 mg/L) ve Previcur (0, 0.5 ve 1 mL/L) (köklenmeyi ve bitki gelişimini teşvik ettiği için fidencilikte kullanılan bir fungusit) eklenerek 8 farklı indüksiyon ortamı hazırlanmıştır. Bu ortamların pH'ı 6'ya ayarlanarak, toplam 8 indüksiyon ortamının etkinlikleri hem anter hem de mikrospor kültürlerinde karşılaştırılmıştır (Çizelge 3.6)

Çizelge 3.6. III. grup androgenesis çalışmalarının anter ve mikrospor kültürlerinde kullanılan indüksiyon ortamlarının içerikleri

Orta m No	Temel Besin Ortam ı	Kineti n (mg/L)	2,4-D (mg/L)	Glutami n (mg/L)	Arabinogalakta n (mg/L)	Timenti n (mg/L)	Previcu r (mL/L)	p H
1	CHB-3*	2	2	500	10	0	0	6
2	CHB-3	2	2	500	10	75	0	6
3	CHB-3	2	2	500	10	150	0	6
4	CHB-3	2	2	500	10	200	0	6
5	CHB-3	2	2	500	10	0	0.5	6
6	CHB-3	2	2	500	10	0	1	6
7	NN**	0	0	0	10	0	40	6
8	NN	2	2	500	10	0	0	6

* CHB-3 ortamı (Chu vd. 1990), ** NN ortamı (Nitsch ve Nitsch, 1969).

III. grup çalışmalarının hem anter, hem de mikrospor kültürü denemelerinin yukarıda bahsedilen indüksiyon ortamlarında oluşan embrioidlerin bitkiye dönüştürülmesi için rejenerasyon ortamı olarak B5 ortamı kullanılmıştır.

Androgenesis çalışmalarında temel besin ortamlarına ilave edilen kimyasallardan 2,4-D, kinetin, aktif karbon, timentin (ticarcillin disodium ve clavulanate potasyum karışımı), arabinogalaktan ve previcur için hazırlanan stok solüsyonların bilgileri Çizelge 3.7 de verilmiştir.

Çizelge 3.7. Androgenesis çalışmalarında kullanılan kimyasalların stok çözelti bilgileri

Stok No	Stoğu Hazırlanan Kimyasal	Kimyasalın Çözücüsü	Stok Konsan-trasyonu (mg/mL)	Stok Hacmi (mL)	Ortamdaki Stok Konsan-trasyonu (ml/L)	Stok Saklama Koşulları (°C)
1	2,4-D	NaOH	1	100	2	+4
2	Kinetin	NaOH	2	100	1	-20
3	Aktif Karbon*	ddH ₂ O	*	100	*	24-25
4	Timentin	ddH ₂ O	100	20	200	-20
5	Arabinogalakt	ddH ₂ O	1	100	10	+4
6	Previcur**	ddH ₂ O	**	**	**	+4

* Aktif karbon stoğu için 0.5 g aktif karbon ve 0.25 g yavaş eriyen agaroz 100 ml ddH₂O 'da çözülmüştür. Otoklavdan sonra oda sıcaklığında muhafaza edilen bu stok petripler kapatılmadan önce 1ml indüksiyon ortam başına 0, 20 ve 40 µl olacak şekilde ilave edilmiştir.

** Sıvı halde olan Previcur ortamlara 0.5 veya 1 mL/L olacak şekilde ilave edilmiştir.

Çalışmada bitkisel materyallerin yüzey dezenfeksiyonu için kullanılan kimyasallara gelince; I. ve II. grup androgenesis çalışmalarında %70'lik etil alkol ve %15'lik ticari hipoklorit solüsyonu, III. yıl çalışmalarında ise %0.2 (a/h) lik cıva klorür muamelesinden sonra %70'lik etil alkol ve %15'lik ticari hipoklorit solüsyonu kullanılmış, durulamalar ise çift damıtılmış su (ddH₂O) ile yapılmıştır.

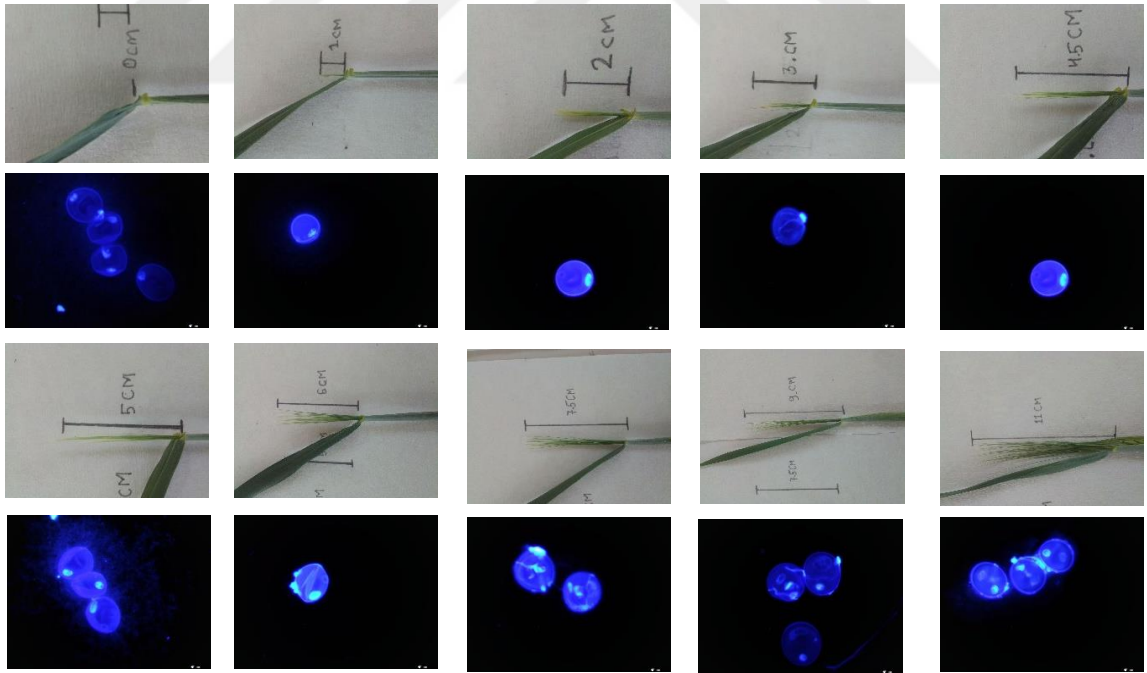
Çalışmada yüksek sıcaklıktan zarar görmeyen içeriğe sahip stok veya ortamların sterilizasyon işlemi 121 °C'de 1 atmosfer basınca sahip otoklavda 15 dakika sürede, yüksek sıcaklıktan zarar gören içeriğe sahip stok veya ortamların sterilizasyonu ise vakum yardımıyla 0.22 µm lik porlara sahip soğuk filtrasyon sistemiyle gerçekleştirilmiştir.

3.1.2. Metot

3.1.2.1. Androgenesis çalışmaları için mikrosporların uygun gelişim aşamalarının belirlenmesi

Buğdayda hem anter, hem de mikrospor kültürü denemeleri için en önemli aşamalardan birisi uygun gelişim aşamasındaki (orta ila geç tek çekirdekli safhadaki) mikrosporları içeren anterlerin ve bunları içeren başakların morfolojilerinin ortaya konulmasıdır. Çalışmanın I., II. ve III. grup androgenesis çalışmalarının başlangıcında kültürleri başlatmadan hemen öncesinde kullanılan farklı genotiplerde bu aşamalar belirlenmeye çalışılmış, daha sonra denemeler başlatılmıştır.

Genotiplere göre değişebilen mikrosporların uygun gelişim aşamaları; farklı büyüklüklerde toplanan başaklardaki anterlerin içerisindeki mikrosporların DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole) boya ile hazırlanan preparatlarının floresan ışık mikroskobu altında araştırılmıştır. Orta - geç tek çekirdekli mikrosporları içeren başak morfolojisine göre bitki materyalleri kullanılmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Androgenesis çalışmaları için mikrosporların uygun gelişim aşamaları



Şekil 3.4. Uygun aşamadaki mikrosporlara sahip başakların ön muamele için hazırlanması

3.1.2.2. Ön muamele

Buğday başakları genel olarak ikinci boğumun tepesinden kesilmiş ve dip kısımdaki yapraklar makas ile kesilerek dipler hemen 50 ml saf su içeren 250 ml'lik şişelere daldırılmıştır. Şişelere yerleştirilmiş sürgün kardeşler +4°C lik karanlıkta 4 gün bekletilmiştir (Şekil 3.4).

3.1.2.3. Yüzey sterilizasyonu

Çalışmanın I. ve II. grup androgenesis çalışmalarında başakların yüzey dezenfeksiyonu için başaklar %70'lik etil alkolde 1 dk bekletilmiş ve ardından 1-2 dk saf suda durulama işlemi yapılmıştır. Daha sonra 1-2 damla Tween 20 eklenmiş %15 lik ticari hipoklorit solüsyonunda 15 dakika muameleden sonra 3 kez steril saf su ile durulama işlemi yapılmıştır.

II. grup androgenesis çalışmalarında rastlanan kontaminasyon problemi nedeniyle III. grup çalışmalarda başakların yüzey dezenfeksiyonu için değişikliğe gidilmiş, bunun için öncelikle başaklara %70 lik etil alkol püskürtülmüş ve alkolün tamamen buharlaşması için 3-4 dk beklenmiştir. Başaklar daha sonra %0.2 lik (a/h) cıva klorür solüsyonunda 5 dk boyunca (Tuveson ve Öhlund, 1993) bekletilmiş ve bunun ardından 2-3 kez saf suyla durulanmıştır. Daha sonra 1-2 damla Tween 20 eklenmiş %15 lik ticari hipoklorit solüsyonunda 15 dk bekletilmiş ve son olarak 3 kez saf suyla durulama işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.5)



Şekil 3.5. Başakların yüzey dezenfeksiyon aşamaları

3.1.2.4. Anter kültürleri

Başaklar yatay hava akışlı steril kabin içerisinde steril pens ve bistüri yardımıyla kesilerek anterleri izole edilmiş ve 6 cm çaplı petri kapları içerisindeki indüksiyon ortamlarına 15 anter + 5 buğday yumurtalığı olacak şekilde yerleştirilmiştir. Bu kültürler, 30°C'de karanlık bir ortamda inkübe edilmiştir. Anter kültürleri düzenli aralıklarla haftada bir kez stereo ve inverted ışık mikroskoplarında gözlemlenmiş (Şekil.3.6) ve kültürden sonraki 10. gün her petri kabına 2 ml yeni ortam eklenmiştir.



7 gün sonra

14 gün sonra

21 gün sonra

28 gün sonra

Şekil 3.6. Anter kültürlerinin mikroskop gözlemlerinden bazı görüntüler

3.1.2.5. Mikrospor kültürleri

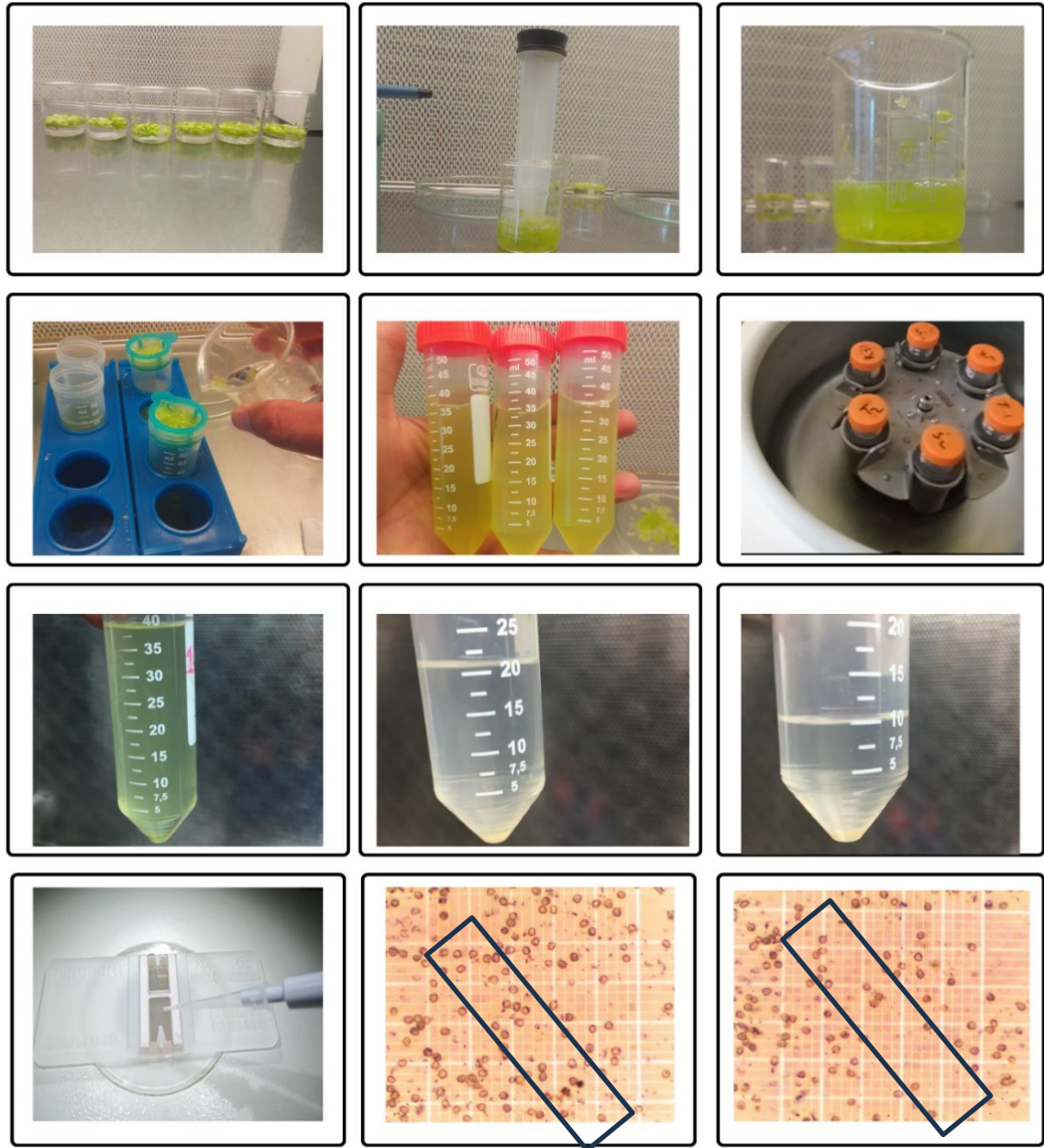
Mikrospor kültürlerine mikrosporların izolasyonu ile başlanmıştır. Mikrosporlar, maceration adı verilen yöntemle (Tuveeson ve Öhlund. 1993) izole edilmiş ve 40 µm lik filtreden geçirilerek FHG makro elementleri (izolasyon ortamı) ile 40 ml'ye kadar tamamlanan 50 ml lik Falcon tüpünde toplanmıştır. Mikrosporlar ardından +4°C'lik 1600 rpm de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiş, santrifüj sonrası tüpün üst kısmındaki sıvı dökülmüş ve izolasyon ortamı ile yıkanarak bu işlem 2 kez daha tekrarlanmıştır. Bu işlemler sonrasında izole edilen mikrospordan ayrı bir tüpü az bir örnek alınarak, elde edilen mikrosporların yoğunluğu ölçülmüştür.

Mikrosporların yoğunluğu, hemocytometer adı verilen bir lam ile aşağıdaki formül kullanılarak tespit edildikten sonra, mL'de 6x10.000 yoğunlukta (60.000 mikrospor/mL) mikrospor olacak şekilde 6 cm çaplı steril petri kaplarına indüksiyon ortamı ile karıştırılarak 7 mL/petri olacak şekilde dağıtılmış ve 30°C'de karanlıkta inkübe edilmiştir.

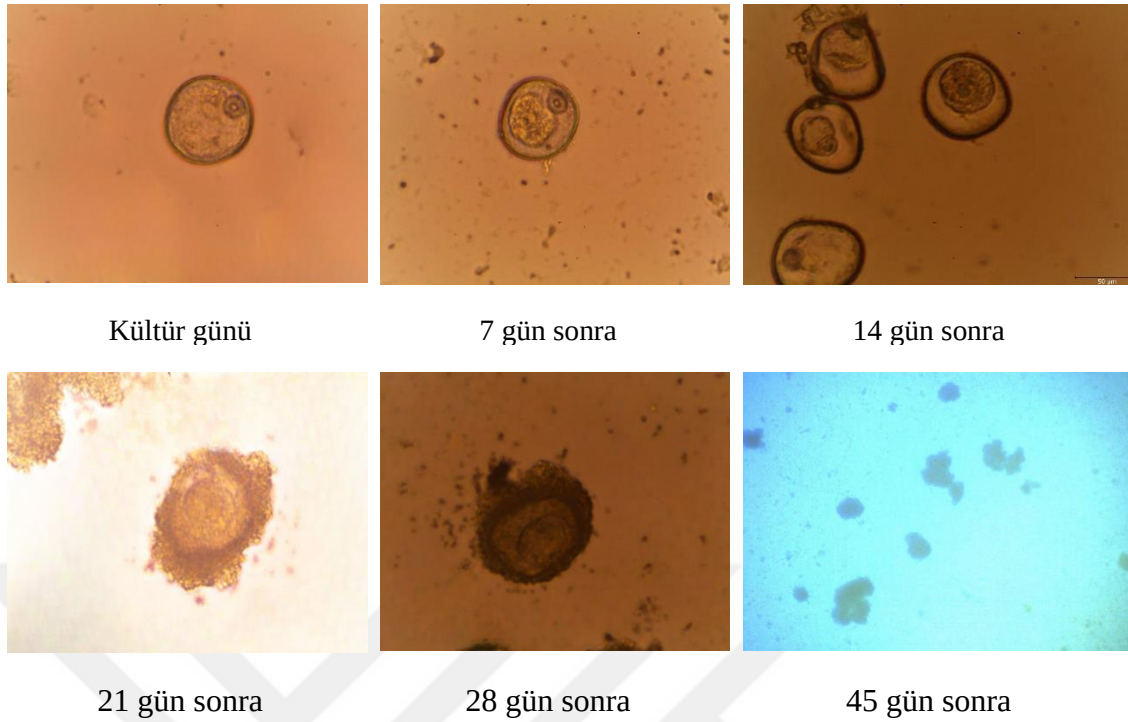
$$\text{Mikrospor yoğunluğu formülü} = \frac{(a1 + a2) * 5 * 5 * 10^4}{6 * 10^4}$$

Formülde, a1 hemocitometre in üst bölmesinden sayılan mikrosporların sayısını ve a2 hemocytometerin alt bölmesinden sayılan mikrosporların sayısını göstermektedir. Formülde daha sonra gelen ilk 5 rakamı son santrifüjden sonra tüpe eklenen indüksiyon ortam hacmini (mL), ikinci 5 rakamı da mikrosporların sayıldığı hemocytometer karelerinin adedini belirtmektedir. 10⁴ değeri (10.000) ise mikrosporların yoğunluğunu temsil etmektedir. Çalışmanın mikrospor kültürlerinde başakların yüzey dezenfeksiyonu sonrasında gerçekleştirilen mikrospor izolasyonu ve mikrospor yoğunluk aşamalarına ait bazı görüntüler Şekil.3.6. da verilmiştir.

Mikrospor kültürleri düzenli aralıklarla haftada bir kez inverted ışık mikroskobu ve kültürün geç aşamalarında ise stereo mikroskop ile gözlemlenmiş (Şekil.3.7) ve kültürden sonraki 10. gün her petri kabına 2 ml yeni ortam eklenmiştir.



Şekil 3.7. Mikrospor kültürlerinde mikrosporların izolasyon ve yoğunluk belirleme aşamaları



Şekil 3.8. Mikrospor kültürlerinin mikroskop gözlemlerinden bazı görüntüler

3.1.2.6. Bitki rejenerasyonu ve aklimatizasyon

Anter ve mikrospor kültürlerinden oluşan embriyolar B5 ve R9 ortamlarına eklenen 0.5 mg/L kinetin + 0.5 mg/L NAA + 5 mg/L askorbik asit ile oluşturulan 9 cm çaplı petrilerdeki katı ortamlara aktarılmıştır. Petri kapları 25 °C ve 16 s fotoperiyot koşullarına sahip iklim odasında bekletilmiştir. İki hafta sonra, yeşil ve albino rejenerantların sayıları sayılmıştır. Bunlar arasından sağlıklı ve yeşil bitkicikler 15 gün için hormonsuz MS tuzları ve NN vitaminlerinden oluşturulan katı ortamdan 30 mL içeren kavanozlara, daha sonra da kök gelişimini teşvik etmek amacıyla aynı ortama 2 mg/L NAA eklenmiş köklendirme ortamına aktarılmıştır. Bu ortamda da 15 gün geçiren yeşil bitkicikler 1:2 perlit:torf karışımı doldurulan küçük saksılara aktarılıp aklimatizasyon işlemleri başlatılmıştır. Bitkicikler 18°C'de ve 16 s fotoperiyot koşullarına sahip bir ortamda 2 hafta süreyle düzenli nemlendirme ve kademeli dış ortama alıştırma işlemlerine tabi tutulmuş ve son olarak 30 cm çaplı saksılara transfer edilmiştir.

3.1.2.7. Araştırma tasarımı ve veri analizi

I. grup androgenesis çalışmalarındaki anter kültürü ön denemeleri faktoriyel RCD (Randomized Complete Design) dizaynda kurulmuştur. Bu denemelerde, 3 genotipin her birinin anterleri 5 indüksiyon ortamında kültüre alınarak embriyo verimi en yüksek genotip ve ortam belirlenmeye çalışılmıştır. Bu nedenle bu denemelerde 2 faktör bulunmaktadır: Faktör A genotipi (3 ekmeklik buğday çeşidi) ve Faktör B ise kullanılan indüksiyon ortamını (5 farklı ortam) ifade etmektedir.

I. grup androgenesis denemelerinde her uygulama 3 tekerrürlü yapılmış, bir petri kabı tek bir tekrar olarak kabul edilmiştir. Her petri kabı için bir başağın orta kısmından on beş anter çıkarılmış ve petri kabına yerleştirilmiştir. Anter kültürlerinde gözlem parametreleri olarak oluşan embriyoid, yeşil bitkicik ve albino bitkicik sayıları kaydedilmiş ve bunların sayısı 100 anter başına ortalama olarak ifade edilmiştir. Verilerin istatistik analizi R Studio (sürüm 4.4.0) programında Kruskal-Wallis testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. I. grup androgenesis çalışmalarındaki anter kültürü denemelerine ait deneme bilgileri Çizelge 3.8 de verilmiştir.

Çizelge 3.8. I. grup androgenesis çalışmalarındaki anter kültürü denemelerine ait deneme bilgileri.

I. Grup Androgenesis Çalışmalarındaki Anter Kültürü Denemeleri	
Faktor A: Genotip Düzey: 3	Faktor B: İndüksiyon Ortamı Düzey: 5
1: Altındane, 2: Dariel, 3: Pehlivan	1: MS-1, 2: MS-2, 3: CHB-3, 4: CHB-3 + MS-2, 5: CHB-3 + %1 DMSO
Deneme Deseni: Faktöriyel RCB	
Tekerrür Sayısı: 3	
Toplam Petri Sayısı: $3 \times 5 \times 3 = 45$	
Toplam Anter Sayısı: 675	

II. grup androgenesis çalışmalarındaki anter ve mikrospor kültürü denemeleri faktöriyel dizaynda gerçekleştirilmiştir. Bu denemelerde, 8 genotipin her birinin hem anterleri hem de mikrosporları 18 indüksiyon ortamında kültüre alınarak embriyo verimi en yüksek genotip ve ortam belirlenmeye çalışılmıştır. Bu nedenle bu denemelerde 3

faktör bulunmaktadır: Faktör A eksplantı (anter ve mikrospor), Faktör B genotipi (4 ekmeklik buğday ve 4 makarnalık buğday çeşidi) ve Faktör C ise kullanılan indüksiyon ortamını (18 farklı ortam) ifade etmektedir.

II. grup androgenesis denemelerinde her uygulama 4 tekerrürlü yapılmış, bir petri kabı tek bir tekrar olarak kabul edilmiştir. Anter kültürlerinde her petri kabı için bir başağın orta kısmından on beş anter çıkarılmış ve petri kabına yerleştirilmiştir. Mikrospor kültürlerinde ise mikrospor yoğunluğu tespit edildikten sonra 6 cm çaplı her bir petri kabına (6×10^4 mikrospor içeren yoğunluğunda) 7 mL indüksiyon ortamı eklenmiştir.

Anter ve mikrospor kültürlerinde gözlem parametreleri olarak oluşan embriyoid, yeşil bitkicik ve albino bitkicik sayıları ile ayrıca mikrospor kültürlerinde mikrospor bölünmesi verileri kaydedilmiş, bunların sayısı 100 anter başına ortalama olarak ifade edilmiştir. Verilerin istatistik analizi R Studio (sürüm 4.4.0) programında Anter ve mikrospor kültür için bazı ortak olmayan parametreler nedeniyle iki yönlü ANOVA analizi yapılarak ve anlamlı farklılıklar için Fisher LSD (0.05) testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. II. grup androgenesis çalışmalarındaki anter ve mikrospor kültürü denemelerine ait deneme bilgileri Çizelge 3.9 da verilmiştir.

Çizelge 3.9. II. grup androgenesis çalışmalarındaki anter ve mikrospor kültürü denemelerine ait deneme bilgileri

II. Grup Androgenesis Çalışmalarındaki Anter ve Mikrospor Kültürü			
Denemeleri			
Faktör A:	Faktör B: Genotip		Faktör C:
Eksplant	Düze y: 8		Ortam
Düze y: 2			Düze y: 18
1: Anter	Makarnalık	Ekmeklik	Çizelge 3.6 da belirtilen ortamlar
2: Mikrospor	1: Svevo	5: Ceyhan 99	
	2: Sarıçanak	6: Sagittario	
	3: Eminbey	7: Bayraktar	
	4: Kızıltan	8: Esperia	
Deneme Deseni: Faktöriyel RCB			
Tekerrür Sayısı: 4			
Toplam Petri Sayısı: 4*8*18*2=1152			
Toplam Anter Sayısı: 8640			
Mikrospor Yoğunluğu/mL: 6*10 ⁴			

III. grup androgenesis çalışmalarındaki anter ve mikrospor kültürü denemeleri de yine faktöriyel dizaynda gerçekleştirilmiştir. Bu denemelerde, 4 genotipin her birinin hem anterleri hem de mikrosporları 8 indüksiyon ortamında kültüre alınarak embriyo verimi en yüksek genotip ve ortam belirlenmeye çalışılmıştır. Bu nedenle bu denemelerde de 3 faktör bulunmaktadır: Faktör A eksplantı (anter ve mikrospor), Faktör B genotipi (2 ekmeklik buğday ve 2 makarnalık buğday çeşidi) ve Faktör C ise kullanılan indüksiyon ortamını (8 farklı ortam) ifade etmektedir.

III. grup androgenesis denemelerinde her uygulama 4 tekerrürlü yapılmış, her tekerrür için 3 petri kabı kullanılmıştır. Anter kültürlerinde her petri kabı için bir başağın orta kısmından on beş anter çıkarılmış ve petri kabına yerleştirilmiştir. Mikrospor kültürlerinde ise mikrospor yoğunluğu tespit edildikten sonra 6 cm çaplı her bir petri kabına (6×10^4 mikrospor içeren yoğunluğunda) 7 mL indüksiyon ortamı eklenmiştir.

Anter ve mikrospor kültürlerinde gözlem parametreleri olarak oluşan embriyoid, yeşil bitkicik ve albino bitkicik sayıları ile ayrıca mikrospor kültürlerinde mikrospor bölünmesi verileri kaydedilmiş, bunların sayısı 100 anter başına ortalama olarak ifade edilmiştir. Verilerin istatistik analizi R Studio (sürüm 4.0.0) programında iki yönlü ANOVA analizi yapılarak ve anlamlı farklılıklar için Fisher LSD (0.05) testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. III. grup androgenesis çalışmalarındaki anter ve mikrospor kültürü denemelerine ait deneme bilgileri Çizelge 3.10 da verilmiştir.

Çizelge 3.10. III. grup androgenesis çalışmalarındaki anter ve mikrospor kültürü denemelerine ait deneme bilgileri

III. Grup Androgenesis Çalışmalarındaki Anter ve Mikrospor Kültürü Denemeleri			
Faktör A: Eksplant Düzey: 2	Faktör B: Genotip Düzey: 4		Faktör C: Ortam Düzey: 8
1: Anter 2: Mikrospor	Makarnalık Genotipler:	Ekmeklik Genotipler:	Çizelge 3.7 de belirtilen ortamlar
	1: Svevo	3: Ceyhan 99	
	2: Sarıçanak	4: Sagittario	
Deneme Deseni: Faktöriyel RCB			
Tekerrür Sayısı: 4 (3 petri/tekerrür)			
Toplam Petri Sayısı: 12*4*8*2=768			
Toplam Anter Sayısı: 5760			
Mikrospor Yoğunluğu/mL: 6*10 ⁴			

3.2. Somatik embriyogenesis çalışmaları

3.2.1. Materyal

3.2.1.1. Bitki materyali

Somatik embriyogenesis denemelerinde bitki materyali olarak makarnalık buğdayda 2 yazlık (Svevo ve Sarıçanak) ile ekmeklik buğdayda 2 yazlık (Ceyhan 99 ve Sagittario) standart çeşitleri olmak üzere toplam 4 buğday genotipi kullanılmıştır. Bu genotiplerden elde edilen steril skutellum parçacıkları ve yaprak dokuları çalışmada eksplant olarak kullanılmıştır.

3.2.1.2. Somatik embriyogenesis çalışmalarında kullanılan besin ortamları ve kimyasal maddeler

Bu çalışmada skutellum ve yaprak eksplantlarının kültürü için 4 ana grup indüksiyon ortam grubu oluşturulmuştur. Bu grupların ana özellikleri, bilhassa indüksiyon ortamlarının temel besin ortamları ve karbonhidrat kaynakları yönünden Çizelge 3.11 de verilmiştir.

Çizelge 3.11. Somatik embriyogenesis çalışmalarındaki 4 ana indüksiyon ortam deneme grubunun temel besin ortamları, karbonhidrat kaynakları ve diğer temel özellikleri (mg/L)

Ana İndüksiyon Ortam Grubu	İndüksiyon Ortamının Temel Besin Ortamı	Karbonhidrat Kaynağı	Ortam Katılaştırıcısı	pH
I. Grup	Modifiye edilmiş MS ortamı [MS ortamı tuzları (Murashige ve Skoog. 1962) + NN vitaminleri (Nitsch ve Nitsch, 1969)]	30 g/L sukroz	3.5 g/L agar + 1.5 g/L gelrite	5.8
II. Grup	Modifiye edilmiş MS ortamı [MS ortamı tuzları (Murashige ve Skoog. 1962) + NN vitaminleri (Nitsch ve Nitsch 1969)]	30 g/L maltoz	3.5 g/L agar + 1.5 g/L gelrite	5.8
III. Grup	Modifiye edilmiş CHB ortamı [CHB-3 ortamı (Chu vd. 1990)]	30 g/L sukroz	3.5 g/L agar + 1.5 g/L gelrite	5.8
IV. Grup	Modifiye edilmiş CHB ortamı [CHB-3 ortamı (Chu vd. 1990)]	30 g/L maltoz	3.5 g/L agar + 1.5 g/L gelrite	5.8

Yukarıdaki 4 ana grubun temel farklılığı; modifiye MS (ModMS) ve modifiye CHB (ModCHB) temel besin ortamlarındaki karbonhidrat içeriğidir. Her iki ortamda da

30 g/L sukroz ile 30 g/L maltozun etkileri ayrı ayrı araştırılmak istenmiştir. Somatik embriyogenesis çalışmalarında kullanılan indüksiyon ortamlarının temel besin ortamları (ModMS ve ModCHB) ve rejenerasyon ortamlarının (ModMS-R1, ModMS-R2, ModCHB-R1 ve ModCHB-R2) içerikleri Çizelge 3.12 de verilmiştir.

Çizelge 3.12. Somatik embriyogenesis çalışmalarında kullanılan indüksiyon ortamlarının temel besin ortamları ve rejenerasyon ortamlarının içerikleri (mg/L)

No	Ortam Bileşenleri	İndüksiyon Temel Ortamları		Rejenerasyon Ortamları				Sürgün ve Kök Geliştirme Ortamı
		Mod-MS	Mod-CHB	ModMS-R1	ModMS-R2	ModCHB R1	ModCHB R2	Westvaco WV5
MAKRO ELEMENTLER								
1	KNO ₃	1900	1415	1900	1900	1000	1000	1084.06
2	(NH ₄) ₂ SO ₄	-	232	-	-	-	-	-
3	MgSO ₄ . 7H ₂ O	370	93	370	370	71	71	903.79
4	KH ₂ PO ₄	170	200	170	170	300	300	270.00
5	CaCl ₂ .2H ₂ O	440	83	440	440	500	500	452.88
6	NH ₄ NO ₃	1650+ 1650	1650	1650+ 1650	1650+ 1650	1000+ 2000	1000+ 2000	700.00
7	KCL					65	65	718.67
MİKRO ELEMENTLER								
1	FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8	-	27.8	27.8	-	-	-
2	MnSO ₄ .5H ₂ O	22.3	3.75	22.3	22.3	4.9	4.9	15.16
3	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	5	8.6	8.6	2.7	2.7	8.60
4	H ₃ BO ₃	100	5	100	100	1.6	1.6	31.00
5	KI	0.8	0.4	0.8	0.8	0.75	0.75	0.83
6	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.025	0.025	0.025	0.076	0.076	0,25
7	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.012	0.25	0.25	0.2	0.2	0.25
8	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.025	0.025	0.025	0.05	0.05	0,025
DEMİR BİLEŞİĞİ								
1	FeNa ₂ EDTA	36.7	40	36.7	36.7	40	40	36.7
VİTAMİNLER								
1	Nicotinic acid	5	0.5	5	5	5	5	-
2	Biotin	0.05	0.25	0.05	0.05	-	-	-
3	Pyridoxine HCl	0.50	0.5	0.50	0.50	5	5	-
4	Thiamine HCl	0.50	2.5	0.50	0.50	1	1	0.40
5	Myo-inositol	100	0.39	100	100	-	-	1000.00

Çizelge 3.12'nin devamı

6	Penththenate	-	0.25	-	-	-	-	-
7	Glycine	2	1	2	2	1	1	-
8	Glutamine	1000	1000	500	500	500	500	-
	Folic acid	0.05	-	0.05	0.05			-
KARBONHİDRAT KAYNAĞI								
1	Sukrose	30000	30000	30000	30000	30000	30000	30000
2	Maltose	30000	30000	-	-	-	-	
BİTKİ GELİŞİM DÜZENLEYİCİ								
1	2,4-D	0/2.5/5	0/2.5/5	-	-	-	-	-
2	Pikloram	0/2.5/5	0/2.5/5	-	-	-	-	-
3	Kinetin	-	-	3	-	3	-	-
4	Zeatin	-	-	-	3		3	-
5	BAP	-	-	1	1	1	1	-
6	NAA	-	-	-	-	-	-	0/2
DİĞER KATKI MADDELERİ								
1	L-Glutamine	0/500	0/500	1000	1000	1000	1000	-
2	Arabino-galactan	0/10	0/10	-	-	-	-	-
3	Gelrite	1500	1500	1500	1500	1500	1500	3000
4	Agar	3500	3500	3500	3500	3500	3500	
5	pH	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8

Temel besin ortamı niteliğindeki yukarıdaki 4 ana grup ortamdan her birisine daha sonra BGD olarak 2,4-D (0, 2.5 ve 5 mg/L) ve Pikloram (0, 2.5 ve 5 mg/L) ile ayrıca Arabinogalakattan (0 ve 10 mg/L), L-glutamin (0 ve 1000 mg/L) ve NH₄NO₃ (0 veya 1650 mg/L) ilave edilerek 9 farklı indüksiyon ortamı oluşturulmuştur. Böylece I. grup, II. grup, III. grup ve IV. grup somatik embriyogenesis denemelerinin her birisinde 9'ar indüksiyon ortamının kallus veya embriyo oluşturma etkileri araştırılmıştır (Çizelge 3.13).

Çizelge 3.13' e göre, 1.ortam her grup için kontrol ortamı niteliğindedir. Bu 9 ortamda oluşan yapıların rejenerasyonu için farklı gruplarda farklı rejenerasyon ortamları kullanılmıştır. Temel besin ortamı ModMS olan I. grup ve II. grup somatik embriyogenesis denemelerinde rejenerasyon ortamları olarak ModMS-R1 ve ModMS-R2 ortamları kullanılmıştır. Temel besin ortamı ModCHB olan III. grup ve IV. grup somatik embriyogenesis denemelerinde ise rejenerasyon ortamları olarak ModCHB-R1 ve ModCHB-R2 ortamları kullanılmıştır. pH değerleri 5.8'e ayarlanan ve farklı BGD (BAP, kinetin ve zeatin) konsantrasyonları ilave edilmiş bu ortamların içerikleri Çizelge 3.12 de verilmiştir. Rejenerasyon ortamlarında gelişen yapıların sürgün ve kök gelişimlerini arttırmak için ise NAA ilave edilmiş Westvaco WV5 ortamı (Coke 1996) kullanılmıştır (Çizelge 3.12).

Çizelge 3.13. I. grup, II. grup, III. grup ve IV. grup somatik embriyogenesis denemelerinin her birisindeki 9’ar indüksiyon ortamının içerikleri

Dört Ana Somatik Embriyogenesis Deneme Grubunun Her Birisindeki İndüksiyon Ortamlarının İçerikleri							
Ortam No	Makro+ Mikro Tuzları	Vitamin	2,4-D (mg/L)	Pikloram (mg/L)	AG (mg/L)	Glutamin (mg/L)	NH ₄ NO ₃ (mg/L)
1	MS	NN	-	-	-	-	-
2	MS	NN	2.5	-	-	500	1650
3	MS	NN	2.5	-	10	500	1650
4	MS	NN	-	2.5	-	500	1650
5	MS	NN	-	2.5	10	500	1650
6	MS	NN	5	-	-	500	1650
7	MS	NN	5	-	10	500	1650
8	MS	NN	-	5	-	500	1650
9	MS	NN	-	5	10	500	1650

Çalışmada bitkisel materyallerin yüzey dezenfeksiyonu için %0.2 (a/h) cıva klorür, %70 lik etil alkol %15 lik ticari hipoklorit solüsyonu ve ddH₂O kullanılmıştır.

Çalışmada yüksek sıcaklıktan zarar görmeyen içeriğe sahip stok veya ortamların sterilizasyon işlemi 121 °C’de 1 atmosfer basınca sahip otoklavda 15 dakika sürede, yüksek sıcaklıktan zarar gören içeriğe sahip stok veya ortamların sterilizasyonu ise vakum yardımıyla 0.22 µm lik porlara sahip soğuk filtrasyon sistemiyle gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Metot

3.2.2.1. Yüzey Dezenfeksiyon

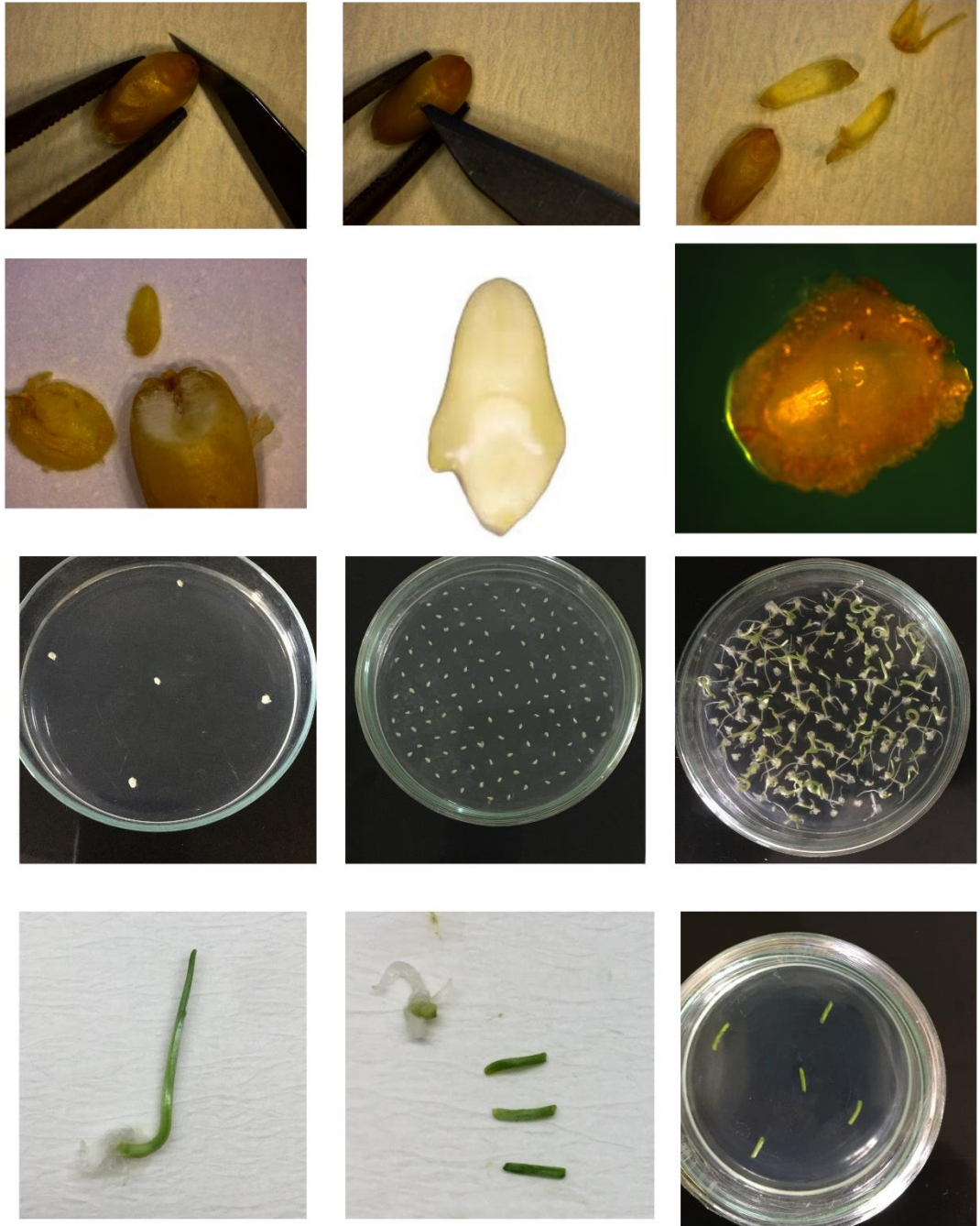
Buğday tohumlarının yüzey dezenfeksiyonu için tohumlar öncelikle steril kabin içinde 100 mL’lik kavonozda 1 dk boyunca %70 lik etanol çözeltisinde karıştırılmış, ardından 2 dk süreyle ddH₂O ile durulanmış, onun ardından 5 dk boyunca %0.2 (a/h) cıva klorür çözeltisinde karıştırılmıştır. Tohumlar daha sonra, 100 mL’lik bir kavanozda 1-2 damla Tween-20 içeren %30 luk ticari hipoklorit çözeltisi kullanılarak 15 dk boyunca ek bir dezenfeksiyon işlemine tabi tutulmuştur. Son olarak, tohumlar her biri yaklaşık 3-4 dk süreyle ddH₂O ile üç kez durulanmıştır (Ari vd. 2021)

3.2.2.2. Eksplantların izolasyonu ve kültürü

Daha önce de belirtildiği gibi somatik embriyogenesis çalışmaları için skutellum ve yaprak olmak üzere 2 tip eksplant kullanılmıştır. Bunları elde edebilmek için tohumlar yüzey dezenfeksiyonundan sonra steril kabin içerisinde 5 saat boyunca steril ddH₂O içinde bekletilerek şişmeleri sağlanmıştır.

Skutellum eksplantları için şişen tohumların skutellumları karyopsisten ayrılmış ve önceden hazırlanmış 6 cm lik petri kaplarındaki kallus indüksiyon ortamlarında kültüre alınmıştır.

Yaprak eksplantlarının eldesi içinse şişen tohumların olgun embriyoları karyopsisten ayrılarak, hormonsuz bir katı MS ortamına ekilmiştir. MS ortamının içeriği; MS tuzları, NN vitaminleri, 180 mg/L adenin hemisülfat, 150 mg/L Na₂H₂P₄, %3 sukroz ve %0.7 agardan oluşturulmuştur. Kültür petri kapları 24°C karanlıkta bekletilmeye başlanmıştır. Embriyolardan çimlenen 3-5 günlük fidelerin genç yaprakları eksplant olarak kullanılmış, bu amaçla her yapraktan yalnızca 2-3 eksplant parçası elde edilmiştir. Yaprak eksplantları ince uzun şekilde gelişen yapraklardan yaklaşık 2 mm olacak şekilde kesilerek indüksiyon ortamına yerleştirilmiş ve 24°C lik 16 saatlik fotoperiyot koşullarına sahip iklim odasında kültüre alınmıştır (Şekil.3.8).



Şekil 3.9. Somatik embriyogenesis için eksplantların izolasyonu ve kültürü

3.2.2.3. Kallus kültürleri, rejenerasyon ve aklimatizasyon

İndüksiyon ortamlarında gelişen 6 haftalık kalluslar eksplantlarından ayrılarak rejenerasyon ortamı içeren 90 mm'lik petri kaplarına aktarılmış ve 25°C lik 16 saatlik fotoperiyot koşullarında kültüre alınmıştır. 10 gün sonra kalluslarda oluşan yeşil noktaların sayısı sayılmıştır. Bu noktalar daha sonra rejenerant bitkicik veya küçük sürgünlere dönüşmüştür. Rejenerant bitkicikler daha iyi büyümeleri için %0.3 gelrite ile katılaştırılmış hormonsuz Westvaco WV5 ortamı (Coke 1996) içeren tüplere aktarılmış, kökleri olmayanlar 2 mg/L NAA içeren aynı ortama yerleştirilmiştir.

Tüplerdeki kültürler düzenli gözlemlenerek sürgün gelişimi veya rejenerant bitkicik oluşum durumu kontrol edilmiştir. İyi gelişmiş sürgün ve köklere sahip *in vitro* bitkicikleri dış koşullara alıştırmak için 3:1:1 oranındaki torf:perlit:vermikülit karışımına sahip küçük saksılara aktararak ve üzerlerini kapatarak aklimatizasyon işlemleri başlatılmıştır. Bu koşullardaki bitkicikler 18°C'de ve 16 saatlik fotoperiyot koşullarına sahip bir ortamda 2-3 hafta süreyle düzenli nemlendirme ve kademeli dış ortama alıştırma işlemlerine tabi tutulmuştur. Dış koşullara alıştırılan rejenerant bitkicikler son olarak 30 cm çaplı saksılara transfer edilmiştir.

3.2.2.4. Araştırma tasarımı ve veri analizi

Somatik embriyogenesis çalışmaları 4 ana indüksiyon ortam deneme gruplarından oluşturulmuş olup, her bir grup faktöriyel tasarım üzerine gerçekleştirilmiştir. Her grupta üç faktör bulunmaktadır: Faktör A eksplantı (skutellum ve yaprak parçası), Faktör B genotipi (2 ekmeklik buğday ve 2 makarnalık buğday çeşidi) ve Faktör C ise kullanılan indüksiyon ortamını (9'ar farklı uygulama) ifade etmektedir. Her bir ortam uygulaması 4 tekerrürlü olarak yapılmış, her tekerrür için indüksiyon ortamı içeren 2 petri kabı kullanılmış ve her bir petri kabında 5 eksplant kültüre alınmıştır.

Somatik embriyogenesis çalışmalarındaki 4 ana indüksiyon ortamı deneme grubunun her bir grubunda kurulan ortam denemelerine ait deneme bilgileri Çizelge 3.14 de verilmiştir.

Çizelge 3.14. Somatik embriyogenesis çalışmalarındaki 4 ana indüksiyon ortamı deneme grubunun her bir grubunda kurulan ortam denemelerine ait deneme bilgileri

Dört Ana Somatik Embriyogenesis Deneme Grubunun Her Birisindeki Ortam Deneme Bilgileri			
Faktör A: Eksplant Düzey: 2	Faktör B: Genotip Düzey: 4		Faktör C: İndüksiyon Ortamı Düzey: 9
1: Skutellum 2: Yaprak	Makarnalık Genotipler:	Ekmeklik Genotipler:	Çizelge 3.13 de belirtilen ortamlar
	1: Svevo	3: Ceyhan 99	
	2: Sarıçanak	4: Sagittario	
Deneme Deseni: Faktöriyel RCB			
Tekerrür Sayısı: 4 (2 petri/tekerrür= 8 petri)			
Her Bir Gruptaki Toplam Petri Sayısı: $8*2*4*9=576$			
Her Bir Gruptaki Toplam Eksplant Sayısı: 2880			

Çizelge 3.14 deki verilerin her bir gruptaki deneme grubuna ait olduğu göz önüne alındığında çalışmanın tezin somatik embriyogenesis çalışmalarında toplam 2.304 (4x576) petride toplam 11.520 eksplant kültüre alınmıştır.

Somatik embriyogenesis denemelerinde alınan gözlem parametreleri; kallus oluşumu (%), embriyojenik kallus oranı (%), kallus büyüklüğü (mm), kallus ağırlığı (mg), yeşil nokta sayısı (adet), kallustan oluşan sürgün sayısı (adet) ve regenerant bitki sayısıdır (adet). Bunlara ait verilerin istatistik analizi R Studio (sürüm 4.4.0) programında üç yönlü ANOVA analizi yapılarak ve anlamlı farklılıklar için Fisher LSD (0.05) testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Somatik embriyogenesis çalışmaların rejenerasyon için 2 ana rejenerasyon ortam deneme gruplarından oluşturulmuş olup, her bir grup faktöriyel tasarım üzerine gerçekleştirilmiştir. Her grupta üç faktör bulunmaktadır: Faktör A eksplantı (skutellum ve yaprak parçası), Faktör B genotipi (2 ekmeklik buğday ve 2 makarnalık buğday çeşidi) ve Faktör C ise kullanılan rejenerasyon ortamını (2’ar farklı uygulama) ifade etmektedir. Her bir ortam uygulamasına indüksiyon ortamından oluşan kalluslar yeşil şekile de aktırılmıştır.

Somatik embriyogenesis çalışmalarındaki rejenerasyon için 2 ana rejenerasyon ortamı deneme grubunun her bir grubunda kurulan ortam denemelerine ait deneme bilgileri Çizelge 3.15 de verilmiştir.

Çizelge 3.15. Somatik embriyogenesis çalışmalarındaki 2 ana rejenesiyon ortamı deneme grubunun her bir grubunda kurulan ortam denemelerine ait deneme bilgileri

Dört Ana Somatik Embriyogenesis Deneme Grubunun Her Birisindeki Ortam Deneme Bilgileri			
Faktör A: Eksplant Düzey: 2	Faktör B: Genotip Düzey: 4		Faktör C: Rejenerasyon Ortamı Düzey: 2
1:Skutellum dan oluşan kallus 2: Yaprak tan oluşan kallus	Makarnalık Genotipler:	Ekmeklik Genotipler:	Çizelge 3.13 de belirtilen ortamlar
	1: Svevo	3: Ceyhan 99	
	2: Sarıçanak	4: Sagittario	
Deneme Deseni: Faktöriyel RCB			

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Androgenesis çalışmaları bulguları

4.1.1. I. Grup androgenesis çalışmaları (anter kültürleri) bulguları

I. grup androgenesis çalışmaları kapsamında Altındane, Dariel ve Pehlivan genotiplerinin her birisinin 5 farklı indüksiyon ortamında test edildiği anter kültürlerinde her 100 anter başına elde edilen ortalama embriyoid, albino bitki ve yeşil bitki sayıları Çizelge 4.1 de verilmiştir.

Çizelge 4.1. I. grup androgenesis çalışmalarında (anter kültürlerinde) her 100 anter başına elde edilen ortalama embriyoid, albino bitki ve yeşil bitki sayıları

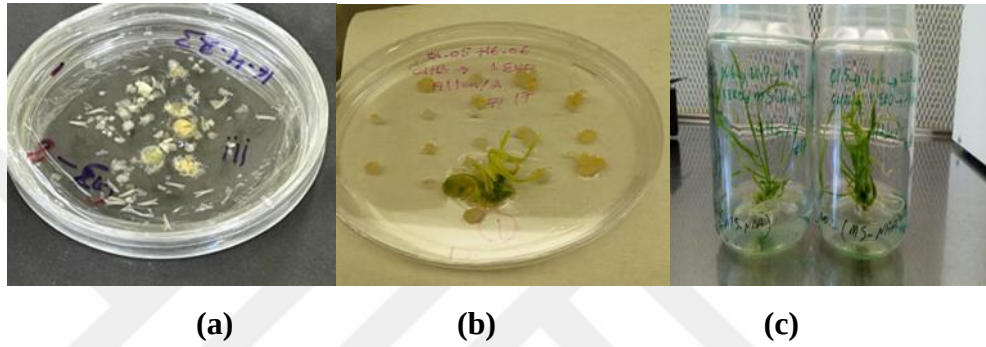
Faktörler	Embriyoid / 100 anter	Albino Bitki / 100 anter	Yeşil Bitki / 100 anter
Genotip (Faktör A)			
Altındane	46.66	8.00	0.88
Dariel	1.33	0.44	0.00
Pehlivan	0.00	0.00	0.00
F- probability	<0.05	<0.05	<0.05
İndüksiyon Ortamı (Faktör B)			
MS-1	0.00	0.00	0.00
MS-2	0.00	0.00	0.00
CHB-3	74.07	8.15	1.48
CHB-3+MS-2	0.00	0.00	0.00
CHB-3+1%DMSO	5.92	5.92	0.00
F- probability	<0.05	<0.05	<0.05
Kruskal-Wallis	0.783	0.783	1

I. grup androgenesis çalışmalarındaki üç genotipin 5 farklı indüksiyon ortamında kültüre alındığı anter kültürlerinde gözlemlenebilir farklılıklar ortaya çıkmıştır. Genotip faktörünün embriyoid oluşturma üzerine etkisi önemli bulunmuştur. En yüksek embriyoid oluşumu Altındane genotipinde (44.66 embriyoid/100 anter) oluşmuştur. Dariel genotipinde 1.33 embriyoid/100 anter elde edilirken, Pehlivan genotipinde hiç embriyoid meydana gelmemiştir.

İndüksiyon ortamı faktörü yönünden en yüksek embriyoid CHB-3 ortamından (74.07 embriyoid/100 anter) elde edilirken, CHB-3+1%DMSO ortamında 5.92 embriyoid/100 anter meydana gelmiş, MS-1, MS-2 ve CHB-3 + MS-2 ortamlarında ise

hiç embriyoid oluşmamıştır. Hem genotip, hem de indüksiyon ortamı faktörü yönünden 100 anterden elde edilen embriyoid ortalaması ise 16 olarak gerçekleşmiştir.

Çalışmada, albino bitki ve yeşil bitki sayısı da genotip faktöründen etkilenmiştir. En yüksek albino bitki üretimi Altındane genotipinde (8 albino bitki/100 anter) gerçekleşirken, Pehlivan genotipinde 0.44 albino bitki/100 anter meydana gelmiştir. Yeşil bitki üretimi ise sadece Altındane genotipinde 0.88/100 anter olarak gerçekleşmiştir. I. grup androgenesis çalışmaları kapsamında yapılan anter kültürlerinde gözlemlenen bazı embriyoid, albino ve yeşil bitkicik oluşumuna ait görüntüler Şekil 4.1. de verilmiştir.



Şekil 4.1. I. grup androgenesis çalışmaları kapsamında yapılan anter kültürlerinde gözlemlenen bazı rejenerasyon oluşumları: (a) indüksiyon ortamında embriyoid üretimi (b) yeşil ve albino bitkilerin rejenerasyonu (c) yeşil rejenere bitkiciklerin gelişimi

4.1.2. II. Grup androgenesis çalışmaları bulguları

4.1.2.1. II. Grup androgenesis çalışmalarındaki anter kültürleri bulguları

II. grup androgenesis çalışmaları kapsamında 8 genotipin her birisinin 18 farklı indüksiyon ortamında test edildiği anter kültürleri verilerine yapılan varyans analizi (ANOVA) sonuçları Çizelge 4.2 de verilmiştir. Çizelge 4.2 ye göre, embriyoid üretimi yönünden genotipler arasında önemli fark oluşmuştur ($F = 4.976$, $P < 0.001$). Bu nedenle kullanılan genotipler arasındaki genetik varyasyonun embriyoid üretimini önemli ölçüde etkilediği ifade edilebilir. Embriyoid üretimi yönünden indüksiyon ortamları arasında da önemli fark ($F = 2.300$, $P < 0.01$) gözlenmiş olup, dolayısıyla indüksiyon ortam içeriğinin de embriyo verimi üzerinde önemli bir rol oynadığını ortaya konulmuştur. Ayrıca, ANOVA sonuçları embriyo üretimi yönünden genotip ve ortam arasındaki interaksiyonun da önemli ölçüde farklı olduğunu göstermektedir ($F = 3.304$, $P < 0.001$) (Veriler gösterilmemiştir). Bu durum, genotip ve ortamın embriyo üretimini bağımsız

olarak etkilemelerine rağmen, interaksiyonlarının da önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.2. II. grup androgenesis çalışmalarının anter kültürlerinde genotiplerin ve ortamların embriyo ve bitki üretme üzerindeki etkileri*

Faktörler	Embriyoid sayısı (adat)	Embriyoid / 100 anter	Albino Bitki sayısı (adat)	Albino Bitki / 100 anter
Genotip (Faktör A)				
Bayraktar	0.00 c	0.00 c	0.00	0.00
Esperia	0.00 c	0.00 c	0.00	0.00
Ceyhan-99	0.45 a	3.00 a	0.09a	0.60a
Sagittario	0.16bc	1.06bc	0.01ab	0.06ab
Eminbey	0.00 c	0.00 c	0.00	0.00
Kızıltan	0.00 c	0.00 c	0.00	0.00
Svevo	0.33b	2.2ab	0.05ab	0.33ab
Sarıçanak	0.00 c	0.00 c	0.00	0.00
F value	4.976		2.222	
SE (+/-)	0.070		0.013	
P r>F	<0.00		0.031	
İndüksiyon Ortamı (Faktör B)				
1	0.06bc	0.41bc	0.02ab	0.13ab
2	0.37ab	2.46ab	0.02ab	0.13ab
3	0.12bc	0.80bc	0.02ab	0.13ab
4	0.03bc	0.2bc	0.00b	0.00b
5	0.05bc	0.80bc	0.02ab	0.13ab
6	0.06bc	0.41bc	0.00b	0.00b
7	0.00c	0.00c	0.00b	0.00b
8	0.71a	4.73a	0.11a	0.73a
9	0.12bc	0.80bc	0.02ab	0.13ab
10	0.00c	0.00c	0.00b	0.00b
11	0.00c	0.00c	0.00b	0.00b
12	0.00c	0.00c	0.00b	0.00b
13	0.50a	3.33a	0.08ab	0.53ab
14	0.00c	0.00c	0.00b	0.00b
15	0.00c	0.00c	0.00b	0.00b
16	0.00c	0.00c	0.00b	0.00b
17	0.06bc	0.41bc	0.00b	0.00b
18	0.00c	0.00c	0.00b	0.00b
LSD (0.05)	0.33		0.097	
F value	2.300		0.805	
SE (+/-)	0.033		0.005	
P r>F	0.002		0.19	
Önemlilik (P)				
Genotip	***			*
Ortamı	**			ÖD
Genel ortalama		0.11		0.01

*LSD testi ile ayrılan ortalamaları için iki yönlü ANOVA kullanılmıştır. Bir sütun içinde farklı harfle ifade edilen ortalamalar $p \leq 0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

Genotip ve indüksiyon ortam gruplarından hangi grubun diğerlerinden farklı olduğunu bulmak için LSD testi yapılmıştır. II. Grup androgenesis çalışmalarının anter kültürlerinde 8 genotipten 3 genotip embriyoid oluşturmuştur. Bunlar arasında en yüksek embriyoid üretimi 3 embriyoid/100 anter ortalama ile Ceyhan-99 dan elde edilirken, en düşük ortalama 1.06 embriyoid/100 anter ile Sagittario genotipinde meydana gelmiştir (Çizelge 4.2).

Genotiplerin kültüre alındığı indüksiyon ortamları arasında ise 18 ortamdan 10 unda embriyoid oluşmuştur. Bunlar arasında en yüksek embriyoid üretimi ortalama 4.73 embriyoid/100 anter ile 8. ortamdan elde edilirken, onu 3.33 embriyoid/100 anter ortalama ile 13. ortam takip etmiştir. En düşük ortalama değer olan 0.2 embriyoid/100 anter ise 4. ortamda meydana gelmiştir (Çizelge 4.2).

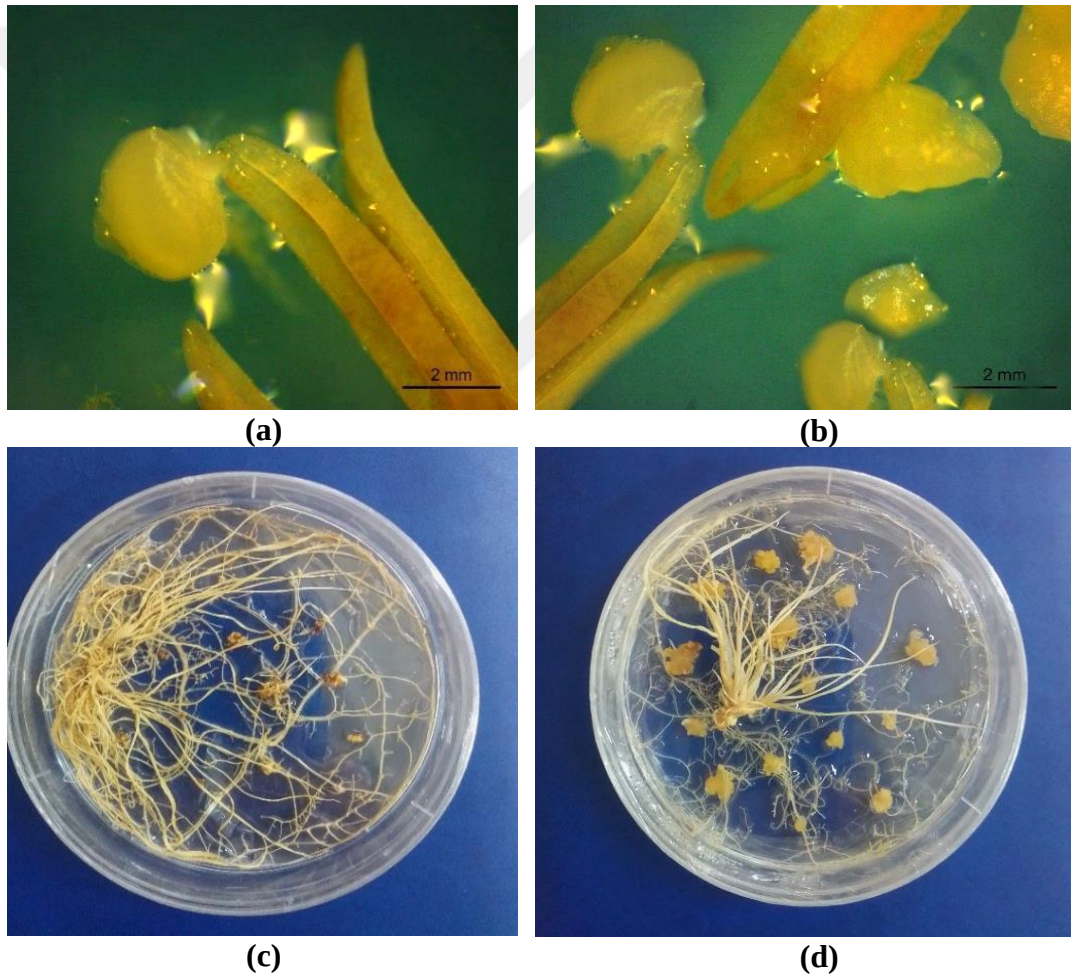
Ortam ve genotip interaksiyonu yönünden ise, en yüksek ortalama embriyo üretimi 8. ortamda kültüre alınan Ceyhan-99 genotipinden (38.3embriyoid/100 anter) elde edilirken, en düşük ortalama değer 1.6 embriyoid/100 anter 4. ortamda kültüre alınan Svevo genotipinde oluşmuştur (Veriler gösterilmemiştir). Embriyoid üretiminde genotip ve ortam interaksiyonu yönünden ayrıca şu gözlemler yapılmıştır: 13. ortamda kültüre alınan Svevo genotipi ortalama 26.6 embriyoid/100 anter, 2. ortamda kültüre alınan Sagittario genotipi ortalama 25 embriyoid/100 anter, 3. ve 9. ortamlarda kültüre alınan Ceyhan-99 genotipi ortalama 6 embriyoid/100 anter ve 1. ortamda kültüre alınan yine Ceyhan-99 genotipi ortalama 3.3 embriyoid/100 anter oluşturmuştur.

II. grup androgenesis çalışmalarının anter kültürlerinde yeşil bitki oluşmamış, sadece albino bitkicikler elde edilmiştir. ANOVA sonuçları albino bitki üretimi yönünden genotipler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir ($F = 2.222$, $P = 0.03$) (Çizelge 4.2). Bu sonuç genotipin albino bitki üretimi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Genotipler arasında en yüksek albino bitki üretimi 0.60 embriyoid/100 anter ortalama değer ile Ceyhan-99 genotipinde gözlenirken, en düşük ortalama değer 0.006 embriyoid/100 anter ortalama değer ile Sagittario genotipinde kaydedilmiştir.

Farklı indüksiyon ortamları arasında albino bitki üretimi yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiş ($F = 0.805$, $P = 0.68$), bu da ortam içeriğinin albino bitki üretimi üzerinde önemli bir etkisinin olmadığını göstermektedir. Farklı indüksiyon ortamları arasında en yüksek albino bitki üretimi 0.73 embriyoid/100 anter ortalama

değerle 8. ortamda, en düşük albino bitki üretimi ise 0.13 embriyoid/100 anter ortalama değerle 9. ortamda meydana gelmiştir.

Ayrıca, genotip ve indüksiyon ortamı arasındaki interaksyon da önemli bulunmamıştır ($F = 1.124$, $P = 0.1975$) (veriler gösterilmemiştir) Bununla birlikte, genotip ve indüksiyon ortamı interaksyonu yönünden en yüksek albino bitki üretimi ortalama 6.66 embriyoid/100 anter değeriyle 8. ortamda kültüre alınan Ceyhan-99 genotipinde oluşurken, en düşük albino bitki üretimi ise ortalama 1.66 embriyoid/100 anter değeriyle 5. ortamda kültüre alınan Svevo genotipinde kaydedilmiştir (veriler gösterilmemiştir) (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. II. grup androgenesis çalışmaları kapsamında yapılan anter kültürlerinde gözlemlenen bazı rejenerasyon oluşumları: (a, b) indüksiyon ortamlarında embriyoid oluşumları, (c, d) anter kültürlerinden oluşan albino bitkicikler

4.1.2.2. II. Grup androgenesis çalışmalarındaki mikrospor kültürleri bulguları

II. grup buğday androgenesis çalışmalarının mikrospor kültürlerinde gözlemlenen ve verisi alınan mikrospor bölünmesi, embriyoid oluşumu, albino bitki oluşumu ve yeşil bitki oluşumu parametreleri için varyans analizi yapılmıştır.

Çizelge 4.3. II. grup androgenesis çalışmalarının mikrospor kültürlerinde genotiplerin ve ortamların mikrospor bölünmesi ve embriyoid verimi üzerine etkileri*

Faktörler	Mikrospor Bölünmesi (%)	2 Bölünmeli Mikrospor	3 Bölünmeli mikrospor	4 Bölünmeli Mikrospor	Embriyoid
Genotip					
Bayraktar	20.41b	0.13b	0.09a	0.06a	0.00a
Esperia	15.97c	0.093c	0.07a	0.03b	0.00a
Ceyhan-99	14.58c	0.12bc	0.09a	0.01cd	1.62a
Sagitaro	27.77a	0.27a	0.10a	0.03b	1.69a
Eminbey	3.19d	0.03d	0.01b	0.00d	0.00a
Kızıltan	1.80d	0.016d	0.002b	0.002d	0.00a
Svevo	24.86a	0.23a	0.08a	0.02bc	1.45a
Sarıçanak	1.94d	0.01d	0.00b	0.00d	0.00a
LSD (0.05)	3.95	0.04	0.02	0.017	-
F value	64.94	37.860	13.390	11.95	1.219
SE (+/-)	4.128	0.038	0.038	0.008	0.106
P r>F	<0.001	<0.05	<0.05	<0.05	0.29
İndüksiyon ortamı					
1	19.06ab	0.15a-c	0.08ab	0.01c	0.00b
2	19.06ab	0.20ab	0.08ab	0.02bc	0.00b
3	17.81a-c	0.15b-d	0.08a	0.05a	0.00b
4	21.87a	0.22a	0.08a	0.02bc	0.00b
5	10.93e-g	0.10c-e	0.05a-e	0.04ab	0.00b
6	13.75b-f	0.09de	0.07a-c	0.02a-c	0.00b
7	16.25b-e	0.12c-e	0.06a-d	0.01c	1.19b
8	12.18d-g	0.10c-e	0.05a-e	0.01c	6.16a
9	13.75b-f	0.10c-e	0.07a-d	0.01c	0.00b
10	10.31fg	0.08e	0.05a-e	0.02bc	2.19-b
11	8.12g	0.10c-e	0.02e	0.01c	0.00b
12	9.06fg	0.071e	0.03c-e	0.01c	0.00b
13	12.18d-g	0.09c-e	0.04b-e	0.01c	0.00b
14	10.93e-g	0.07e	0.05a-e	0.006c	0.00b
15	12.18d-g	0.10c-e	0.03de	0.006c	0.00b
16	12.81c-g	0.07e	0.04a-e	0.02bc	0.00b
17	16.56a-d	0.12c-e	0.06a-e	0.02bc	0.00b
18	11.87d-g	0.09c-e	0.05a-e	0.006c	0.00b
LSD (0.05)	3.38	0.06	0.04	0.026	3.03
F value	3.829	3.418	1.535	1.519	1.928
SE (+/-)	0.668	0.007	0.003	0.002	0.089
P r>F	<0.001	<0.05	0.07	0.07	0.01
İnd.Ortamı	***	***	ÖD	ÖD	*
Genel ortalama	13.81	0.11	0.05	0.02	0.53

*LSD testi ile ayrılan ortalamaları karşılaştırmak için iki yönlü ANOVA kullanılmıştır. Bir sütun içinde farklı harfle ifade edilen ortalamalar p<0.05 düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

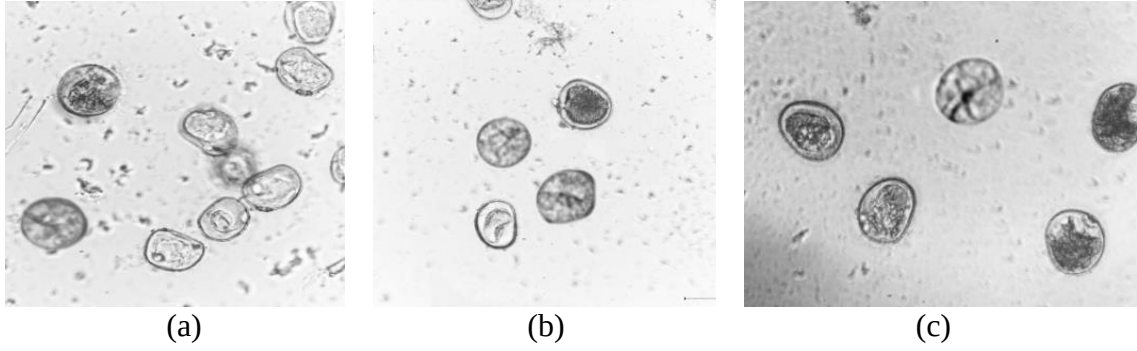
ANOVA sonuçları, genotipler arasında (F = 64.94, P < 0.001) ve ortamlar arasında (F = 3.829, P < 0.001) mikrospor bölünmesi yönünden önemli bir fark olduğunu ve ayrıca

genotip ve ortam etkileşiminin de mikrospor bölünmesinde önemli fark oluşturduğunu göstermiştir ($F = 2.35$, $P < 0.001$) (Çizelge 4.3). Hangi grupların birbirinden farklı olduğunu belirlemek için Fisher LSD testi uygulanmıştır. Genotipler için LSD değeri 3.95 bulunmuştur. En yüksek mikrospor bölünmesi 27.77 ortalama değer ile Sagittario genotipinde gözlenirken, en düşük mikrospor bölünmesi 1.80 ortalama değer ile Kızıltan genotipinde gözlenmiştir.

Ortamlar arasındaki LSD değeri ise 5.38 olarak bulunmuştur. En yüksek mikrospor bölünmesi ortalama 21.87 değeriyle 4. Ortamda, en düşük mikrospor bölünmesi ise ortalama 8.12 değeriyle 11. ortamda gözlenmiştir (Çizelge 4.3).

Genotip ve ortam arasındaki interaksiyon için LSD değeri 15.24 olarak tespit edilmiştir. En yüksek mikrospor bölünmesi 45 ortalama değer ile 3., ve 4. Ortamda kültüre alınan Sagittario genotipinde ve 4. Ortamda Svevo genotipta, en düşük mikrospor bölünmesi ise 2.5 ortalama değer ile 8. Ortamda kültüre alınan Sarıçanak genotipte gözlenmiştir (Çizelge 4.4).

Mikroskop altında yapılan erken gözlemlerde mikrosporların kaç defa (2 defa, 3 defa ve 4 defa) bölündüğüne ilişkin (Şekil 4.2) alınan verilere yapılan ANOVA sonuçları da yine Çizelge 4.3 de belirtilmiştir. Örneğin 2 bölünmeli mikrosporların varyans analizine göre genotipler arasında ($F = 37.860$, $P < 0.001$) ve indüksiyon ortamları arasında ($F = 3.418$, $P < 0.001$) ve ayrıca genotip ve ortam interaksiyonu arasında ($F = 2.381$, $P < 0.001$) önemli farklılıklar olduğu belirlenmiştir. Grupların diğerlerinden farklı olup olmadığını değerlendirmek için yapılan Fisher LSD testinde genotipler için LSD değeri 0.04 olarak bulunmuş olup, en yüksek 2 bölünmeli mikrospor ortalaması (0.27) Sagittario genotipinde, en düşük değer ortalama (0.01 ise Kızıltan genotipinde gözlemlenmiştir. İndüksiyon ortamlarındaki LSD değeri 0.06 olarak belirlenmiş olup, en yüksek 2 bölünmeli mikrospor 0.22 ortalama değer ile 4. ortamda, en düşük 2 bölünmeli mikrospor ise 0.07 ortalama değer ile 11. ortamda gözlemlenmiştir (Çizelge 4.3).



Şekil 4.3. Erken evrede mikroskopta yapılan gözlemlerde rastlanan mikrosporların bölünme sayılarına göre gelişimleri; (a) 2 bölünmeli mikrospor, (b) 3 bölünmeli mikrospor (c) 4 bölünmeli mikrosporlar.

Çizelge 4.4. II. Grup androgenesis çalışmalarının mikrospor kültürlerinde genotip x ortam interaksiyonunun mikrospor bölünmesi (%) üzerine etkileri*

İndüksiyon Ortamı	Mikrospor Bölünmesi Gözlemlerinin Yapıldığı Genotipler							
	Bayraktar	Esperia	Ceyhan-99	Sagitario	Eminbey	Kızıltan	Svevo	Sarıcanak
1	30.0a-f	30.0a-f	10.0h-l	15.0f-l	17.5 e-k	0.0l	45.0a	5.0j-l
2	35.0a-d	27.5b-g	25.0c-h	30.0a-f	2.5kl	0.0l	32.5a-e	0.0l
3	27.5b-g	12.5g-l	10.0h-l	45.0a	2.5kl	0.0l	42.5ab	2.5kl
4	42.5ab	10.0h-l	27.5b-g	45.0a	2.5kl	0.0l	45.0a	2.5kl
5	17.5e-k	12.5g-l	5.0j-l	22.5d-i	5.0j-l	0.0l	25.0c-h	0.0l
6	12.5g-l	22.5di	15.0 f-l	25.0c-h	0.0l	0.0l	32.5a-e	2.5kl
7	7.5i-l	25.0c-h	20.0d-j	30.0a-f	2.5kl	5.0j-l	40.0a-c	0.0l
8	17.5e-k	17.5e-k	7.5i-l	25.0c-h	2.5kl	2.5kl	22.5d-i	2.5kl
9	22.5d-i	7.5i-l	2.5kl	30.0a-f	0.0l	5.0j-l	42.5ab	0.0l
10	10.0h-l	22.5d-i	15.0f-l	20.0d-j	5.0j-l	2.5kl	7.5i-l	0.0l
11	7.5i-l	10.0h-l	12.5g-l	30.0a-f	5.0j-l	0.0l	0.0l	0.0l
12	15.0f-l	2.5kl	10.0h-l	42.5ab	2.5kl	0.0l	0.0l	0.0l
13	15.0f-l	7.5i-l	7.5i-l	20.0d-j	0.0l	0.0l	45.0a	2.5kl
14	20.0d-j	15.0f-l	15.0f-l	27.5b-g	0.0l	0.0l	10.0h-l	0.0l
15	17.5e-k	15.0f-l	17.5e-k	17.5e-k	0.0l	5.0j-l	20.0d-j	5.0j-l
16	30.0a-f	27.5b-g	17.5e-k	20.0d-j	0.0l	5.0j-l	0.0l	2.5kl
17	15.0f-l	15.0f-l	20.0d-j	30.0a-f	10.0h-l	5.0j-l	32.5a-e	5.0j-l
18	25.0c-h	7.5i-l	25.0c-h	0.00	5.0j-l	2.5kl	5.00j-l	5.0j-l
LSD (0.05)		15.24						
SE (+/-)		0.185						
Pr>F		<0.05						
Önemlilik (P)		***						
Genel ortalama		13.81						

* LSD testi ile ayrılan ortalamaları ve genotip interaksiyonunun karşılaştırmak için iki yönlü ANOVA kullanılmıştır. Bir sütun içinde farklı harfle ifade edilen ortalamalar $p \leq 0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

İki bölünmeli mikrospor verilerinin genotip x ortam interaksyonu için LSD değeri 0.18 olarak bulunmuştur. 2 bölünmeli mikrosporlar en yüksek (ortalama = 0.72) 4. Ortamda kültüre alınan Bayraktar genotipinde, en düşük (ortalama = 0.025) ise 8. ortamda kültüre alınan Sarıçanak genotipinde gözlemlenmiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. II. Grup androgenesis çalışmalarının mikrospor kültürlerinde genotip x ortam interaksyonunun 2 bölünmeli mikrospor gelişimi üzerine etkileri*

İnd. Ortam	2 Bölünmeli Mikrospor Gözlemlerinin Yapıldığı Genotipler							
	Bayraktar	Esperia	Ceyhan-99	Sagitario	Eminbey	Kızıltan	Svevo	Sarıçanak
1	0.25e-l	0.17h-o	0.02no	0.15i-o	0.15i-o	0.00	0.47b-d	0.05m-o
2	0.25e-l	0.25e-l	0.35c-h	0.50bc	0.02no	0.00	0.30d-j	0.00
3	0.15i-o	0.00	0.07l-o	0.57ab	0.02no	0.00	0.40b-f	0.02no
4	0.72a	0.02no	0.37c-g	0.20g-n	0.02no	0.00	0.42b-e	0.02no
5	0.12j-o	0.10k-o	0.05m-o	0.25e-l	0.05m-o	0.00	0.22f-m	0.00
6	0.00	0.10k-o	0.10k-o	0.17h-o	0.00	0.00	0.32c-i	0.02no
7	0.05m-o	0.07l-o	0.10k-o	0.35c-h	0.02no	0.05m-o	0.37c-g	0.00
8	0.10k-o	0.20g-n	0.05m-o	0.17h-o	0.02no	0.00	0.25e-l	0.02no
9	0.02no	0.07l-o	0.02no	0.35c-h	0.05m-o	0.05m-o	0.35c-h	0.00
10	0.02no	0.22f-m	0.12j-o	0.12j-o	0.05m-o	0.02no	0.07l-o	0.00
11	0.05m-o	0.05m-o	0.27e-k	0.37c-g	0.05m-o	0.00	0.00	0.00
12	0.02no	0.00	0.10k-o	0.42b-e	0.02no	0.00	0.00	0.00
13	0.07l-o	0.05m-o	0.02no	0.17h-o	0.00	0.00	0.42b-e	0.02no
14	0.05m-o	0.05m-o	0.12j-o	0.30d-j	0.00	0.00	0.10k-o	0.00
15	0.22f-m	0.00	0.12j-o	0.15i-o	0.00	0.05m-o	0.20g-n	0.05m-o
16	0.12j-o	0.17h-o	0.05m-o	0.17h-o	0.05m-o	0.05m-o	0.00	0.02no
17	0.05m-o	0.07l-o	0.15i-o	0.22f-m	0.10k-o	0.05m-o	0.32c-i	0.05m-o
18	0.20g-n	0.05m-o	0.15i-o	0.22f-m	0.00	0.02no	0.05m-o	0.05m-o
LSD (0.05)		0.18						
F value		37.86						
SEm (+-)		0.002						
Pr>F		<0.05						
Önemlilik (P)		***						
Genel ortalma		0.11						

* LSD testi ile ayrılan ortalamaları ve genotipler arasında interaksyonunun arşılaştırmak için iki yönlü ANOVA kullanılmıştır. Bir sütun içinde farklı harfle ifade edilen ortalamalar $p \leq 0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

3 bölünmeli mikrosporların varyans analizine göre, genotipler ($F = 13.39$, $P < 0.05$) ve genotip-ortam interaksyon ($F = 1.931$, $P < 0.001$) arasında önemli farklılıklar

bulunmuştur. Ancak ortamlar arasında ($F = 1.535$, $P = 0.07$) 3 bölünmeli mikrospor gelişimi yönünden önemli farklılıklar yoktur (Çizelge 4.3). Genotiplerin LSD değeri 0.028 olup, Sagittario genotipi 3 bölünmeli mikrospor gelişimi yönünden en yüksek (0.27) ortalama değeri, Kızıltan genotipi ise en düşük değeri (0.002) vermiştir (Çizelge 4.3). ortamların LSD değeri ise 0.04 olup, en yüksek (0.087) 3 bölünmeli mikrospor 3.ortamda, en düşük (0.025) 3 bölünmeli mikrospor ise 11. ortamda oluşmuştur (Çizelge 4.3). Genotip x ortam interaksyonu için LSD 0.12 olup, en yüksek ortalama (0.27) 3 bölünmeli mikrospor 9. ortamda kültüre alınan Bayraktar genotipinde gözlemlenirken, en düşük ortalama (0.025) ise 10. ortamda kültüre alınan Svevo genotipindedir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. II. Grup androgenesis çalışmalarının mikrospor kültürlerinde genotip x ortam interaksyonunun 3 bölünmeli mikrospor gelişimi üzerine etkileri*

Ind. Ortam	3 Bölünmeli Mikrospor Gözlemlerinin Yapıldığı Genotipler							
	Bayraktar	Esperia	Ceyhan-99	Sagittario	Eminbey	Kızıltan	Svevo	Sarıçanak
1	0.05f-h	0.17a-e	0.07e-h	0.10d-h	0.05f-h	0.00h	0.20a-d	0.00h
2	0.02gh	0.20a-d	0.20a-d	0.12c-g	0.00h	0.00h	0.10d-h	0.00h
3	0.20a-d	0.00h	0.07e-h	0.27a	0.02gh	0.00h	0.12c-g	0.00h
4	0.17a-e	0.02gh	0.25ab	0.12c-g	0.00h	0.00h	0.12c-g	0.00h
5	0.10d-h	0.05f-h	0.02gh	0.12c-g	0.07e-h	0.00h	0.10d-h	0.00h
6	0.07e-h	0.15b-f	0.10d-h	0.07e-h	0.00h	0.00h	0.22a-c	0.00h
7	0.05f-h	0.20a-d	0.02gh	0.17a-e	0.00h	0.00h	0.10d-h	0.00h
8	0.10d-h	0.12c-g	0.05f-h	0.10d-h	0.02gh	0.00h	0.00h	0.00h
9	0.27a	0.02gh	0.00h	0.07e-h	0.00h	0.00h	0.20a-d	0.00h
10	0.00h	0.10d-h	0.10d-h	0.07e-h	0.07e-h	0.02gh	0.02gh	0.00h
11	0.00h	0.00h	0.02gh	0.17a-e	0.00h	0.00h	0.00h	0.00h
12	0.02gh	0.00h	0.10d-h	0.17a-e	0.00h	0.00h	0.00h	0.00h
13	0.02gh	0.10d-h	0.02gh	0.02gh	0.00h	0.00h	0.17a-e	0.00h
14	0.17a-e	0.02gh	0.20a-d	0.02gh	0.00h	0.00h	0.00h	0.00h
15	0.10d-h	0.07e-h	0.05f-h	0.02gh	0.00h	0.00h	0.00h	0.00h
16	0.17a-e	0.05f-h	0.12c-g	0.00h	0.00h	0.02gh	0.00h	0.00h
17	0.07e-h	0.07e-h	0.10d-h	0.12c-g	0.00h	0.00h	0.15b-f	0.00h
18	0.15b-f	0.02gh	0.22a-c	0.02gh	0.00h	0.00h	0.00h	0.00h
LSD (0.05)		0.12						
F value		1.931						
SEm(+/-)		0.001						
Pr>F		<0.05						
Önemlilik (P)		***						
Genel ortalma		0.059						

* LSD testi ile ayrılan ortalamaları karşılaştırmak için iki yönlü ANOVA kullanılmıştır. Bir sütun içinde farklı harfle ifade edilen ortalamalar $p \leq 0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

4 bölünmeli mikrosporların varyans analizine göre, genotipler arasında ($F = 11.91$, $P < 0.05$) ve genotip x ortam interaksiyonunda ($F = 1.931$, $P < 0.001$) önemli farklılıklar bulunmuştur. Ancak ortamlarda önemli farklılıklar olmamıştır ($F = 1.519$, $P = 0.07$). Grupların birbirinden farklı olup olmadığını belirlemek için yapılan LSD testinde genotiplerin LSD değeri 0.017 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.7. II. Grup androgenesis çalışmalarının mikrospor kültürlerinde genotip x ortam interaksiyonunun 4 bölünmeli mikrospor gelişimi üzerine etkileri*

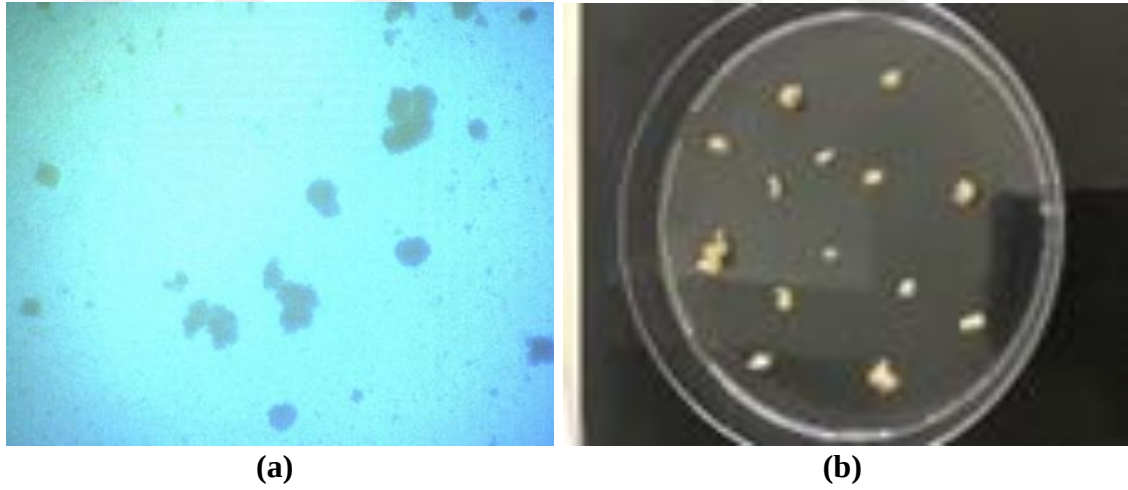
İnd. Ortamı	4 Bölünmeli Mikrospor Gözlemlerinin Yapıldığı Genotipler							
	Bayraktar	Esperia	Ceyhan-99	Sagitario	Eminbey	Kızıltan	Svevo	Sarıçanak
1	0.00e	0.05c-e	0.025de	0.00e	0.00e	0.00e	0.07b-e	0.00e
2	0.00e	0.10b-d	0.00e	0.00e	0.00e	0.00e	0.07b-e	0.00e
3	0.05c-e	0.12a-c	0.025de	0.12a-c	0.00e	0.00e	0.07b-e	0.00e
4	0.07b-e	0.025de	0.00e	0.05c-e	0.00e	0.00e	0.025de	0.00e
5	0.20a	0.025de	0.00e	0.15ab	0.00e	0.00e	0.00e	0.00e
6	0.025de	0.12a-c	0.00e	0.025de	0.00e	0.00e	0.05c-e	0.00e
7	0.025de	0.025de	0.07b-e	0.00e	0.00e	0.00e	0.025de	0.00e
8	0.05c-e	0.05c-e	0.00e	0.00e	0.00e	0.00e	0.00e	0.00e
9	0.07b-e	0.025de	0.00e	0.00e	0.00e	0.025de	0.025de	0.00e
10	0.10b-d	0.025de	0.00e	0.025de	0.00e	0.025de	0.00e	0.00e
11	0.00e	0.00e	0.025de	0.10b-d	0.00e	0.00e	0.00e	0.00e
12	0.10b-d	0.00e	0.025de	0.025de	0.00e	0.00e	0.00e	0.00e
13	0.07b-e	0.00e	0.025de	0.00e	0.00e	0.00e	0.025de	0.00e
14	0.025de	0.00e	0.00e	0.025de	0.00e	0.00e	0.00e	0.00e
15	0.05c-e	0.00e	0.00e	0.00e	0.00e	0.00e	0.00e	0.00e
16	0.12a-c	0.025de	0.025de	0.00e	0.00e	0.00e	0.00e	0.00e
17	0.125a-c	0.00e	0.00e	0.05c-e	0.00e	0.00e	0.00e	0.00e
18	0.05c-e	0.00e	0.00e	0.00e	0.00e	0.00e	0.00e	0.00e
LSD (0.05)		0.12						
F value		1.931						
SEm (+/-)		0.0006						
Pr>F		<0.05						
Önemlilik (P)		***						
Genel ortalma		0.059						

* LSD testi ile ayrılan ortalamaları karşılaştırmak için iki yönlü ANOVA kullanılmıştır. Bir sütun içinde farklı harfle ifade edilen ortalamalar $p \leq 0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

Bayraktar genotipi 4 bölünmeli mikrospor gelişimi yönünden en yüksek (0.063) ortalama değeri verirken, Kızıltan genotipi ise en düşük ortalamayı (0.002) göstermiştir

(Çizelge 4.3). ortamların LSD değeri ise 0.026 olarak bulunmuştur. En yüksek (0,05) 4 bölünmeli mikrospor ortalaması 3. ortamda, en düşük (0.062) 4 bölünmeli mikrospor ise 18. ortamda meydana gelmiştir (Çizelge 4.3). Genotip x ortam interaksyonu için LSD 0.075 olup, en yüksek ortalama (0.27) 4 bölünmeli mikrospor 5. ortamda kültüre alınan Bayraktar genotipinde gözlemlenirken, en düşük ortalama (0.025) ise 9. ortamda kültüre alınan Svevo genotipinde kaydedilmiştir (Çizelge 4.7).

Faktörlerin embriyoid verimi üzerine etkilerini belirlemek için yapılan varyans analizinde ise genotipler arasında ($F = 1.094$ ve $P = 0.36$) önemli bir fark tespit edilmemiştir. İndüksiyon ortamları ($F = 1.784$ ve $P = 0.02$) arasında ise önemli farklılıklar bulunmuştur. Genotip ve ortam arasındaki interaksiyon yönünden ($F = 1.106$ ve $P = 0.23$) ise önemli bir fark belirlenmemiştir. Hangi indüksiyon ortamının embriyo üretiminde önemli farklılıklara sahip olduğunu belirlemek için yapılan LSD testinde ortamların LSD değeri 3.31 olarak bulunmuş olup, en yüksek (ortalama 6.5) embriyo üretimi 6. ortamda, en düşük (ortalama 1.19) embriyo üretimi ise 7. ortamda gerçekleşmiştir (Çizelge 4.3). Ancak bu embriyolar rejenerasyon ortamlarına aktarıldığında herhangi bir albino veya yeşil bitkiye dönüşmemiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.4. II. grup androgenesis çalışmaları kapsamında yapılan mikrospor kültürlerindeki embriyo gelişimleri; (a) İndüksiyon ortamında oluşan embriyolar, (b) rejenerasyon ortamına aktarılan embriyolar

4.1.3. III. Grup androgenesis çalışmaları bulguları

4.1.3.1. III. Grup androgenesis çalışmalarındaki anter kültürleri bulguları

III. grup androgenesis çalışmaları kapsamında 4 genotipin her birisinin 8 farklı indüksiyon ortamında test edildiği anter kültürleri verilerine yapılan varyans analizi (ANOVA) sonuçları Çizelge 4.8 de verilmiştir.

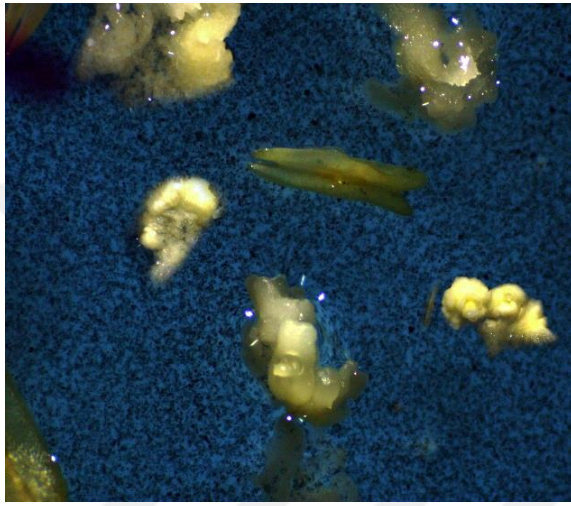
Çizelge 4.8. III. Grup androgenesis çalışmalarının anter kültürlerinde genotip ve indüksiyon ortamlarının embriyoid ve albino bitki oluşumu üzerine etkileri*

Faktörler	Embriyoid sayısı (adat)	Embriyoid / 100 anter	Albino Bitki sayısı (adat)	Albino Bitki / 100 anter
Genotip (Faktör A)				
Ceyhan-99	0.60a	4.00a	0.01a	0.06a
Sagittario	2.39a	15.93a	0.00a	0.00a
Svevo	0.03a	2.00a	0.00a	0.00a
Sarıçanak	0.09a	0.06a	0.00a	0.00a
LSD (0.05)	3.19		0.01	
F value	0.937		1	
SE (+/-)	0.479		0.002	
P r>F	0.42		0.39	
İndüksiyon Ortamı (Faktör B)				
1	0.35b	2.33b	0.02a	0.13a
2	0.12b	0.8b	0.00a	0.00a
3	4.87a	32.46a	0.00a	0.00a
4	0.64ab	4.26ab	0.00a	0.00a
5	0.25b	1.66b	0.00a	0.00a
6	0.00b	0.00b	0.00a	0.00a
7	0.00b	0.00b	0.00a	0.00a
8	0.00b	0.00b	0.00a	0.00a
LSD (0.05)	4.49		0.02	
F value	1.067		1	
SE (+/-)	0.361		0.001	
P r>F	0.38		0.43	
Önemlilik (P)				
Genotip	ÖD		ÖD	
Ortamı	ÖD		ÖD	
Genel ortalama	0.02		0.78	

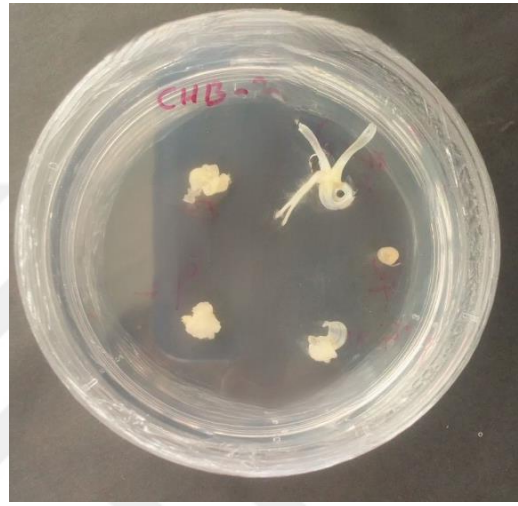
*LSD testi ile ayrılan ortalamaları karşılaştırmak için iki yönlü ANOVA kullanılmıştır. Bir sütun içinde farklı harfle ifade edilen ortalamalar $p \leq 0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

Çizelge 4.8' e göre, embriyoid üretimi yönünden genotipler ($F = 0.937$, $P = 0.42$), indüksiyon ortamları ($F = 1.067$, $P = 0.38$) veya bunların interaksyonu ($F = 0.972$, $P = 0.49$) arasında önemli bir fark oluşmamıştır. Benzer şekilde, albino bitki üretimi yönünden de genotipler ($F = 1$, $P = 0.93$), ortamlar ($F = 1$, $P = 0.46$) veya genotip x indüksiyon ortamı interaksyonu ($F = 1$, $P = 0.46$) arasında önemli bir fark meydana

gelmemiştir. Bununla birlikte, en yüksek embriyoid verimi ortalama 15.93 ile Sagittario genotipinden elde edilirken, en düşük embriyoid verimi ortalama 2.00 ile Svevo genotipinden elde edilmiştir. Sekiz indüksiyon ortamından 5'i tepki oluşturmuş, bunlar arasından en yüksek embriyoid verimi ortalama 32.46/100 anter ile 3. ortamdan, en düşük embriyoid verimi ise ortalama 0.08/ 100 anter ile 2.ortamdan elde edilmiştir (Şekil 4.6a) (Çizelge 4.8).



(a)



(b)

Şekil 4.5. III. grup androgenesis çalışmaları kapsamında yapılan anter kültürlerinde gözlemlenen bazı rejenerasyon oluşumları; (a) anter kültürlerinden elde edilen embriyoidler, (b) anter kültürlerinden elde edilen bir albino bitki

Genotip x indüksiyon ortamı interaksyonu ile ilgili olarak, en yüksek embriyoid verimi ortalama 18.16 ile 3. ortamda kültüre alınan Sagittario genotipinden elde edilirken, en düşük embriyoid verimi ortalama 0.08 ile 3. ortamda kültüre alınan Svevo genotipinden elde edilmiştir (Çizelge 4.9,4.10). Yeşil bitki oluşumunun gerçekleşmediği III. grup androgenesis çalışmalarındaki anter kültürlerinde albino bitki üretimi yönünden ise sadece 1. ortamda kültüre alınan Ceyhan-99 genotipinde albino bitki meydana gelmiştir (Şekil 4.6b).

Çizelge 4.9. III. grup androgenesis çalışmalarının anter kültürlerinde genotip x ortam interaksyonunun embriyo ve albino bitki oluşumu üzerindeki etkisi*

İnd. Ortamı	Genotiplerin Embriyoid Verimi (adat)				Genotiplerin Embriyoid Verimi (100 anter)			
	Ceyhan-99	Sagitarıo	Svevo	Sarıçanak	Ceyhan-99	Sagitarıo	Svevo	Sarıçanak
1	1.41b	0.00b	0.00b	0.00b	9.40b	0.00b	0.00b	0.00b
2	0.00b	0.00b	0.00b	0.50b	0.00b	0.00b	0.00b	3.33b
3	1.00b	18.16a	0.08b	0.25b	6.66b	121.1a	0.08b	1.66b
4	2.41a	0.00b	0.16b	0.00b	16.06a	0.00b	1.06b	0.00b
5	0.00b	1.00b	0.00b	0.00b	0.00b	6.66b	0.00b	0.00b
6	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b
7	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b
8	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b
LSD (0.05)	8.99							
F value	0.972							
SE (+/-)	0.172							
P r>F	0.49							
Genel ortalama	0.78							
İnd. Ortamı	Genotiplerin Albino Bitki Verimi (adat)				Genotiplerin Albino Bitki Verimi (100 anter)			
	Ceyhan-99	Sagitarıo	Svevo	Sarıçanak	Ceyhan-99	Sagitarıo	Svevo	Sarıçanak
1	0.08a	0.00b	0.00b	0.00b	0.53a	0.00b	0.00b	0.00b
2	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b
3	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b
4	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b
5	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b
6	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b
7	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b
8	0.08a	0.00b	0.00b	0.00b	0.53a	0.00b	0.00b	0.00b
LSD (0.05)	0.04							
F value	1							
SE (+/-)	0.0007							
P r>F	0.46							
Genel ortalama	0.02							

* LSD testi ile ayrılan ortalamaları karşılaştırmak için iki yönlü ANOVA kullanılmıştır. Bir sütun içinde farklı harfle ifade edilen ortalamalar $p \leq 0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

4.1.3.2. III. Grup androgenesis çalışmalarındaki mikrospor kültürleri bulguları

III. grup buğday androgenesis çalışmaları kapsamında 4 genotipin her birisinin 8 farklı indüksiyon ortamında test edildiği mikrospor kültürlerinde gözlemlenen ve verisi alınan mikrospor bölünmesi, embriyoid oluşumu ve albino bitki oluşumu parametreleri için varyans analizi yapılmıştır (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. III. grup androgenesis çalışmalarının mikrospor kültürlerinde genotip ve ortamların mikrospor bölünmesi, embriyoid ve albino bitki verimi üzerine etkileri*

Faktör	Mikrospor Bölünmesi (%)	2 Bölünmeli Mikro-spor	3 Bölünmeli Mikro-spor	4 Bölünmeli Mikro-spor	Embriyoid Sayısı	Albino Bitki Sayısı
Genotip						
Ceyhan-99	32.70a	0.23a	0.13a	0.08a	4.55a	0.01a
Sagitaro	15.32b	0.09b	0.06b	0.02b	0.07b	0.01a
Svevo	10.10c	0.05c	0.02c	0.01bc	2.67ab	0.00a
Sarıçanak	7.18	0.04c	0.02c	0.07c	0.00b	0.00a
Toplam						
LSD (0.05)	2.92	0.02	0.02	0.01	3.85	0.00a
F value	117.43	89.918	46.072	34.117	2.526	0.667
SEm (+-)	15.64	0.122	0.071	0.045	0.954	0.002
P r>F	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	0.05	0.57
İndüksiyon ortam						
1	26.25ab	0.18a	0.10a	0.056a	2.72ab	0.00a
2	28.33ab	0.17ab	0.10a	0.056a	4.22ab	0.00a
3	24.60b	0.14bc	0.10a	0.050ab	0.37b	0.00a
4	28.95a	0.17ab	0.11a	0.068a	0.83b	0.02a
5	1.87d	0.01d	0.006c	0.000c	0.00b	0.00a
6	1.04d	0.01d	0.006c	0.000c	0.00b	0.00a
7	16.66c	0.12c	0.05b	0.033b	6.41a	0.02a
8	2.91d	0.02d	0.004c	0.002c	0.02b	0.00a
LSD (0.05)	4.13	0.03	0.03	0.022	4.45	0.02
F value	117.43	33.433	21.842	12.788	1.512	0.857
SEm (+-)	8.55	0.052	0.034	0.019	0.521	0.002
P r>F	<0.05	<0.05	<0.05	0.07	0.16	0.541
Önemlilik (P)						
Genotip	***	***	***	***	.	ÖD
Ortamı	***	***	***	***	ÖD	ÖD
Genel Ortalama	16.33	0.10	0.06	0.003	1.82	0.005

* LSD testi ile ayrılan ortalamaları karşılaştırmak için iki yönlü ANOVA kullanılmıştır. Bir sütun içinde farklı harfle ifade edilen ortalamalar $p \leq 0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

Çizelge 4.10 daki ANOVA sonuçları genotipler ($F=17.43$, $p < 0.001$), ortam ($F=10.25$, $p < 0.001$) ve genotip x ortam interaksyonu ($F=12.58$, $p < 0.001$) yönünden önemli farklılıklar göstermiştir. Hangi grupların birbirinden farklı olduğunu belirlemek için Fisher LSD testi uygulanmıştır. Genotipler için LSD değeri 2.91 bulunmuştur. En yüksek mikrospor bölünmesi 32.70 ortalama değer ile Ceyhan-99 genotipinde gözlenirken, en düşük mikrospor bölünmesi 7.18 ortalama değer ile Sarıçanak genotipinde gözlenmiştir.

Ortamlar arasındaki LSD değeri ise 4.13 olarak bulunmuştur. En yüksek mikrospor bölünmesi ortalama 28.95 değeriyle 4. ortamda, en düşük mikrospor bölünmesi ise ortalama 1.04 değeriyle 6. ortamda gözlenmiştir (Çizelge 4.10).

Genotip ve ortam interaksyonu için LSD değeri 8.26 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.11). En yüksek mikrospor bölünmesi 67.50 ortalama değer ile 4. ortamda kültüre alınan Ceyhan-99 genotipinde, en düşük mikrospor bölünmesi ise tepki veren ortamlar arasından 0.83 ortalama değer ile yine 4. ortamda kültüre alınan Sarıçanak'ta gözlenmiştir (Çizelge 4.11). Bu da farklı genotiplerin aynı ortama farklı tepkiler verdiğinin göstergesi sayılabilir.

Çizelge 4.11. III. grup androgenesis çalışmalarının mikrospor kültürlerinde genotip x ortam interaksyonunun mikrospor bölünmesi üzerine etkileri*

İndüksiyon Ortamı	Mikrospor Bölünmesi Gözlemlerinin Yapıldığı Genotipler			
	Ceyhan-99	Sagitario	Svevo	Sarıçanak
1	49.16b	19.16ef	20.00ef	16.67fg
2	47.50bc	30.00d	20.00ef	15.83fg
3	40.83c	25.09de	16.66fg	15.83fg
4	67.50a	31.66d	15.83fg	0.83i
5	4.16hi	2.50hi	0.83i	0.00i
6	3.33hi	0.00i	0.83i	0.00i
7	47.50bc	10.00gh	5.83hi	3.33hi
8	1.66i	4.16hi	0.83i	5.00hi
LSD (0.05)	8.26			
F value	12.58			
SE (+/-)	1.81			
Pr>F	<0.05			
Önemlilik (P)	***			
Genel ortalma	16.33			

* LSD testi ile ayrılan ortalamaları karşılaştırmak için iki yönlü ANOVA kullanılmıştır. Bir sütun içinde farklı harfle ifade edilen ortalamalar $p \leq 0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

Mikroskop altında yapılan erken gözlemlerde mikrosporların kaç defa (2 defa, 3 defa ve 4 defa) bölündüğüne ilişkin alınan verilere yapılan ANOVA sonuçları Çizelge 4.12 de verilmiştir. İki bölünmeli mikrosporların varyans analizine göre genotipler arasında ($F=89.918$, $p < 0.001$), indüksiyon ortamları arasında ($F=33.433$, $p < 0.001$) ve genotip x ortam interaksyonu arasında ($F=8.059$, $p < 0.001$) önemli farklılıklar olduğu belirlenmiştir. Hangi grupların birbirinden farklı olduğunu belirlemek için, ANOVA

testini 0.05 değeriinde Fisher LSD testi izlemiştir. Genotipler için LSD değeri 0.02 olarak bulunmuş olup, en yüksek 2 bölünmeli mikrospor ortalaması (0.23) Ceyhan-99 genotipinde, en düşük ortalama (0.04) ise Sarıçanak genotipinde gözlenmiştir. İndüksiyon ortamlarındaki LSD değeri 0.03 olup, en yüksek 2 bölünmeli mikrospor 0.18 ortalama ile 1. ortamda, en düşük 2 bölünmeli mikrospor ise 0.01 ortalama ile 5. ve 6. ortamda gözlemlenmiştir (Çizelge 4.10). Genotip x ortam interaksyonu için LSD test değeri 0.07 olarak bulunmuştur. En yüksek 2 bölünmeli mikrospor 0.40 ortalama ile 1. ortamda kültüre alınan Ceyhan-99 genotipinde, en düşük mikrospor ise 0.008 ortalama ile 4. ortamda Sarıçanak genotipinde gözlemlenmiştir (Çizelge 4.12).

3 bölünmeli mikrosporların varyans analizine göre, genotipler ($F=46.072$, $p < 0.001$), ortam ($F=21.84$, $p < 0.001$) ve genotip x ortam interaksyonu ($F=6.405$, $p < 0.001$) için önemli farklılıklar göstermiştir. Grupların farklılığını belirlemek için yapılan Fisher LSD testinde genotiplerin LSD değeri 0.21 olup, Ceyhan-99 genotipi 3 bölünmeli mikrospor gelişimi yönünden en yüksek (0.13) ortalamayı verirken, Sarıçanak genotipi ise en düşük ortalamayı (0.02) vermiştir (Çizelge 4.12). Ortamların LSD değeri 0.03 olarak bulunmuştur. En yüksek (0.11) 3 bölünmeli mikrospor 4. ortamda, en düşük (0.004) 3 bölünmeli mikrospor ise 8. ortamda meydana gelmiştir (Çizelge 4.12). Genotip x ortam interaksyonu için LSD 0.06 olup, en yüksek ortalama (0.35) 3 bölünmeli mikrospor 4. ortamda kültüre alınan Ceyhan-99 genotipinde gözlemlenirken, en düşük ortalama (0.08) ise 8. ortamda kültüre alınan Sarıçanak genotipinde kaydedilmiştir (Çizelge 4.12).

4 bölünmeli mikrosporların varyans analizine göre, genotip ($F=34.117$, $p < 0.001$), indüksiyon ortamı ($F=12.78$, $p < 0.001$) ve genotip x ortam interaksyonu ($F=5.738$, $p < 0.001$) yönünden önemli farklılıklar bulunmuştur. Grupların birbirinden farklı olup olmadığını belirlemek için yapılan LSD testinde genotiplerin LSD değeri 0.015 olarak belirlenmiştir. En yüksek 4 bölünmeli mikrospor 0.08 ortalama ile Ceyhan-99 genotipinde gözlenirken, en düşük mikrospor 0.007 ortalama ile Sarıçanak genotipinde gözlenmiştir. Ortam için LSD değeri 0.02'dir. 4 bölünmeli mikrosporların en yüksek bulunduğu ortam 0.06 ortalama ile 4. ortam iken, en düşük bulunduğu ortam ise 0.002 ortalama ile 8. ortamdır (Çizelge 4.10). Genotip ve ortam interaksyon için LSD değeri 0.04 olup, en yüksek (0.22) 4 bölünmeli mikrospor 4. ortamda kültüre alınan Ceyhan-99

genotipinde gözlemlenirken, en düşük ortalama (0.008) ise 9. ortamda kültüre alınan Sarıçanak genotipinde kaydedilmiştir (Çizelge 4.12).



Çizelge 4.12. III. grup androgenesis çalışmalarının mikrospor kültürlerinde genotip x ortam interaksiyonunun 2, 3 ve 4 bölünmeli mikrospor gelişimleri üzerine etkileri*

İnd. Ort.	2 Bölünmeli Mikrosporlar				3 Bölünmeli Mikrosporlar				4 Bölünmeli Mikrosporlar			
	Ceyhan-99	Sagitario	Svevo	Sarıçanak	Ceyhan-99	Sagitario	Svevo	Sarıçanak	Ceyhan-99	Sagitario	Svevo	Sarıçanak
1	0.40a	0.10d-g	0.11d-f	0.11d-f	0.21b	0.10d-f	0.05e-i	0.03g-i	0.08b-d	0.07b-e	0.03e-h	0.03e-h
2	0.34ab	0.17cd	0.05f-j	0.10d-g	0.15b-d	0.15b-d	0.07e-h	0.04f-i	0.11b	0.03e-h	0.06c-f	0.008h
3	0.31b	0.15c-e	0.07f-i	0.04g-j	0.15b-d	0.10c-e	0.05e-i	0.09e-g	0.11b	0.05d-g	0.008h	0.01gh
4	0.38ab	0.21c	0.08e-h	0.008ij	0.35a	0.09e-g	0.03g-i	0.00i	0.22a	0.04d-h	0.008h	0.008h
5	0.02h-j	0.02h-j	0.008ij	0.00j	0.02hi	0.00i	0.00i	0.00i	0.008h	0.008h	0.008h	0.008h
6	0.03h-j	0.00j	0.008ij	0.00j	0.02hi	0.00i	0.00i	0.00i	0.008h	0.008h	0.008h	0.008h
7	0.35ab	0.07f-i	0.05f-j	0.01h-j	0.16bc	0.01hi	0.01hi	0.01hi	0.10bc	0.02f-h	0.008h	0.008h
8	0.01h-j	0.03h-j	0.00j	0.04g-j	0.00i	0.008i	0.00i	0.008i	0.008h	0.008h	0.008h	0.008h
LSD (0.05)	0.07				0.06				0.04			
F value	8.059				6.405				5.738			
SEm(+/-)	0.012				0.009				0.006			
Pr > F	<0.05				<0.05				<0.05			
Önemlilik (P)	***				***				***			
Genel ortalama	0.10				0.06				0.03			

* LSD testi ile ayrılan ortalamaları karşılaştırmak için iki yönlü ANOVA kullanılmıştır. Bir sütun içinde farklı harfle ifade edilen ortalamalar $p \leq 0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

Embriyoid verimi yönünden ANOVA sonuçları genotip ve ortam interaksyonu için önemli farklılıklar gösterirken ($F=1.706$, $p=0.02$), genotipler ($F=2.526$, $p=0.05$) ve ortam ($F=1.512$, $p=0.168$) için farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Hangi grupların farklılık gösterdiğini belirlemek için yapılan LSD testinin genotipler için LSD değeri 3.85 olup, en yüksek embriyoid üretimi Ceyhan-99 genotipinde (ortalama = 4.55) ve en düşük embriyoid üretimi Sagittario genotipinde (ortalama = 0.07) meydana gelmiştir. Ortam için LSD değeri 5.45'tir. En yüksek embriyoid verimi 7. ortam (ortalama = 6.41) ve en düşük embriyoid verimi 8. ortamda (ortalama = 0.02) gerçekleşmiştir (Çizelge 4.10). Genotip x ortam interaksyonu için LSD değeri 10.90'dır. En yüksek embriyoid verimi 7. ortamda kültüre alınan Ceyhan-99 genotipinde (ortalama = 25,25), en düşük embriyoid verimi ise 8. ortamda kültüre alınan Svevo genotipinde oluşmuştur (Şekil 4.7a) (Çizelge 4.13).

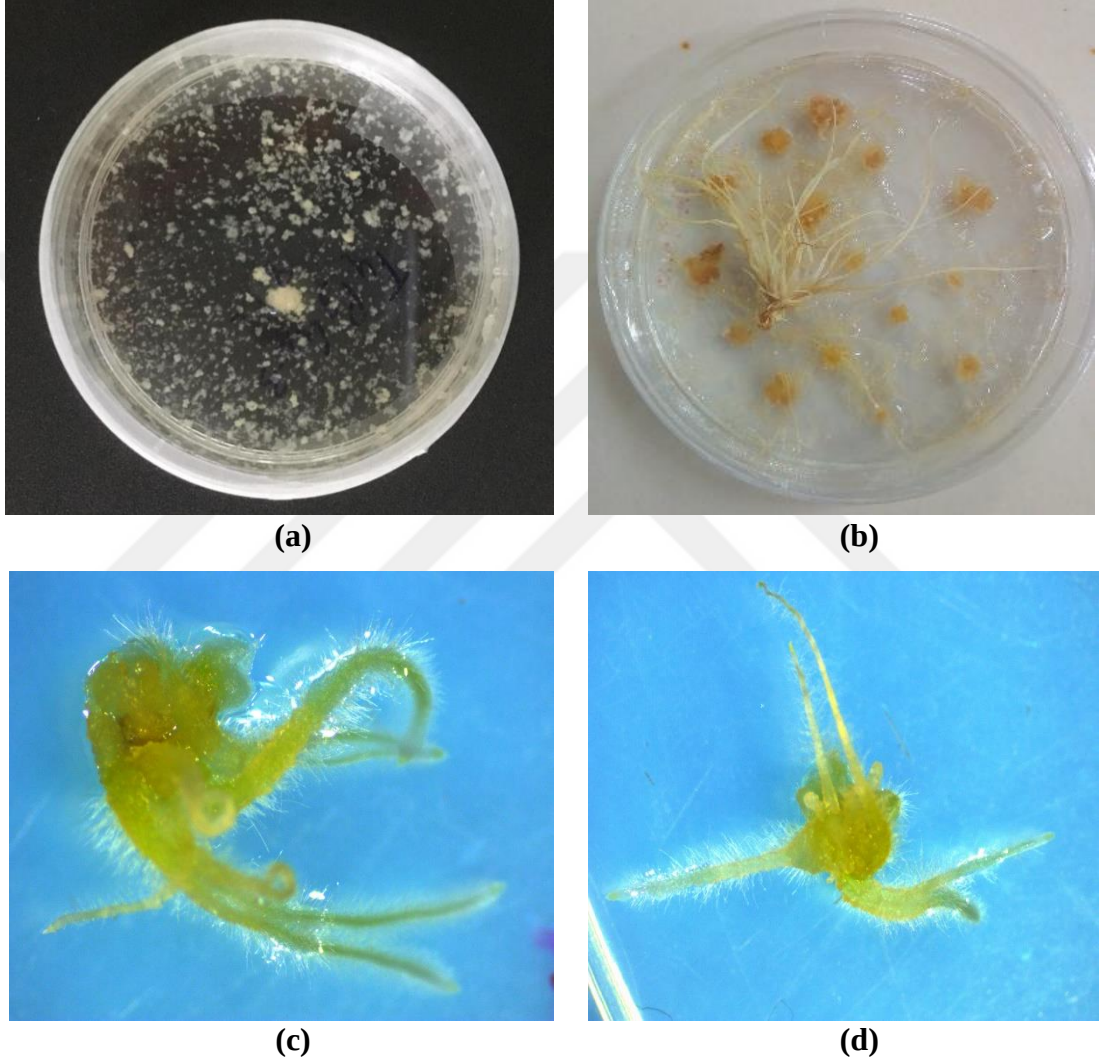
Çizelge 4.13. III. grup androgenesis çalışmalarının mikrospor kültürlerinde genotip x ortam interaksyonunun embriyoid ve albino bitki oluşumu üzerine etkisi*

İnd. Ortamı	Genotiplerin Embriyoid Verimi				Genotiplerin Albino Bitki Verimi			
	Ceyhan-99	Sagittario	Svevo	Sarıçanak	Ceyhan-99	Sagittario	Svevo	Sarıçanak
1	5,50bc	0.00c	5.41bc	0.00c	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b
2	1.91c	0.00c	15.00ab	0.00c	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b
3	0.66c	0.08c	0.75c	0.00c	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b
4	3.08c	0.25c	0.00c	0.00c	0.08a	0.00b	0.00b	0.00b
5	0.00c	0.00c	0.00c	0.00c	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b
6	0.00c	0.00c	0.00c	0.00c	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b
7	25.25a	0.25c	0.16c	0.00c	0.00b	0.08a	0.00b	0.00b
8	0.00c	0.00c	0.08c	0.00c	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b
LSD (0.05)		10.90			0.05			
F value		6.405			1.048			
SE (+/-)		0.227			0.001			
P r>F		0.02			0.40			
Önemlilik (P)		*			ÖD			
Genel ortalama	1.82				0.005			

* LSD testi ile ayrılan ortalamaları karşılaştırmak için iki yönlü ANOVA kullanılmıştır. Bir sütun içinde farklı harfle ifade edilen ortalamalar $p \leq 0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

Albino bitki oluşumu yönünden ANOVA sonuçları genotipler ($F = 0.667$, $P = 0.57$), ortamlar ($F = 0.857$, $P = 0.541$) ve bunların interaksyonu ($F = 1.048$, $P = 0.405$) arasında önemli bir fark olmadığını göstermektedir (Çizelge 4.10). Bu sonuç genotip ve ortamlardaki varyasyonların yanı sıra bunların interaksyon etkilerinin albino bitkilerin oluşumunu önemli ölçüde etkilemediğini göstermektedir (Şekil 4.7.b). Benzer şekilde,

yeşil sürgün üretimi için genotipler ($F = 0.0$, $P = 0.39$), ortam ($F = 1.0$, $P = 0.43$) veya genotipler ve ortam arasındaki interaksiyon ($F = 1.0$, $P = 0.462$) arasında önemli bir fark olmadığını göstermektedir. Bu sonuç, incelenen faktörlerin üretilen yeşil sürgün sayısı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkiye sahip olmadığı anlamına gelmektedir (Veriler gösterilmemiştir) (Şekil 4.7.c).



Şekil 4.6. (a) Mikrospor kültürlerinden elde edilen embriyoidler, (b) mikrospor kültürlerinden elde edilen albino bitki, (c, d) Mikrospor kültürlerinden elde edilen yeşil sürgünler

4.2. Somatik embriyogenesis çalışmaları bulguları

4.2.1. I. Grup somatik embriyogenesis deneme bulguları

4.2.1.1. Genotip, eksplant ve indüksiyon ortamı faktörlerinin toplam kallus oluşumu, embriyojenik kallus oranı, kallus boyutu ve kallus ağırlığı üzerine etkileri

I. grup somatik embriyogenesis denemelerinde; 4 buğday genotipinin skutellum ve yaprak eksplantlarının her birisi temel besin ortamı Modifiye edilmiş MS ortamı olan ve 30 gr/L sukroz karbonhidrat kaynağı eklenmiş 9 farklı indüksiyon ortamında kültüre alınmıştır. Bu denemelerde eksplant tipi, genotip ve ortamın kallus oluşumu, embriyojenik kallus oranı, kallus boyutu ve kallus ağırlığı üzerindeki etkilerini belirlemek için üç yönlü varyans analizi yapılmıştır (Çizelge 4.14).

Çizelge 4.14' e göre eksplant skutellum veya yaprak) fatörü; kallus oluşumu ($F=566.374$, $p < 0.001$), embriyojenik kallus oranı ($F=200.65$, $p < 0.001$), kallus boyutu ($F=150.157$, $p < 0.001$) ve kallus ağırlığı ($F=183.559$, $p < 0.001$) üzerinde oldukça önemli bir etkiye sahiptir. Bu durum, kullanılan eksplant türünün buğday somatik embriyogenesisinde kallus oluşumu, embriyojenik kallus oluşumu, kallus boyutu ve kallus ağırlığı üzerinde kritik bir faktör olduğunu göstermektedir. Skutellum eksplantları, yaprak segmentlerine göre daha fazla kallus, embriyojenik kallus ve daha büyük kallus üretmiştir, ancak kallus ağırlığı yaprak eksplantında daha yüksek olmuştur (Çizelge 4.14).

Genotip faktörü; kallus oluşumu ($F= 1.920$, $p = 0.12$) ve kallus boyutu ($F = 0.614$, $p = 0.60$) üzerine önemli ölçüde etkide bulunmazken, embriyojenik kallus üretimi ($F= 12.08$, $p < 0.001$) ve kallus ağırlığı ($F=14.724$, $p < 0,001$) üzerinde oldukça önemli bir etkiye sahiptir. Bu, kallus üretiminde gözlenen varyasyonların esas olarak test edilen 4 genotip arasındaki farklılıklardan kaynaklanmadığını göstermektedir. Bununla birlikte, genotip faktörünü de içeren interaksiyonların etkisinin önemli bulunması, genotipin diğer faktörlerle birlikte rol oynadığını göstermektedir (Çizelge 4.14).

İndüksiyon ortamı faktörü; kallus üretimi ($F= 58.422$, $p < 0.001$) embriyojenik kallus oranı ($F= 50.82$, $p < 0.001$), kallus boyutu ($F= 39.230$, $p < 0.001$) ve kallus ağırlığı ($F= 10486$, $p < 0.001$) üzerinde oldukça önemli etkiye sahiptir. Farklı ortam bileşimleri kallus üretiminde önemli farklılıklara yol açarak başarılı bir somatik embriyogenesis için indüksiyon ortamının optimize edilmesinin önemini ortaya koymuştur (Çizelge 4.14).

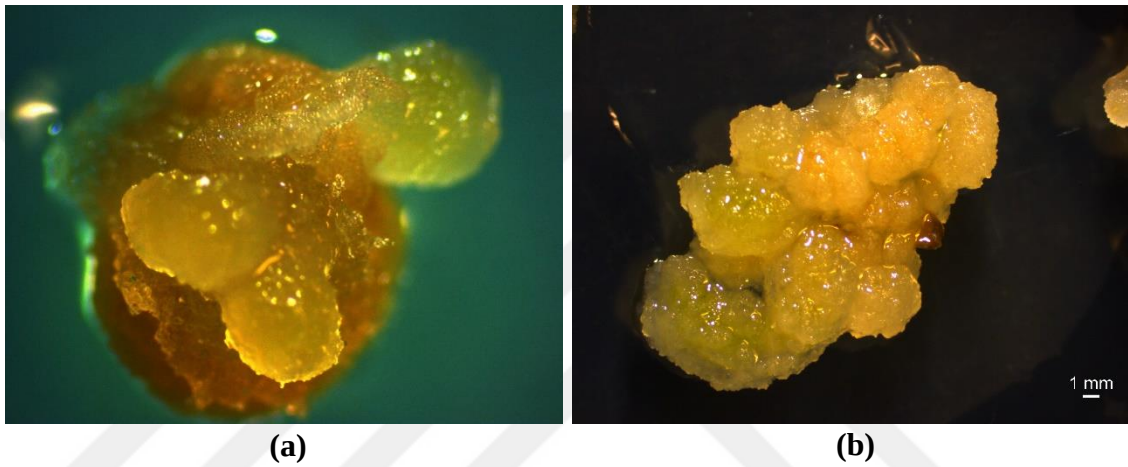
Çizelge 4.14. I. Grup somatik embriyogenesis denemelerinde genotip, eksplant ve indüksiyon ortamının toplam kallus oluşumu, embriyojenik kallus oranı, kallus boyutu ve kallus ağırlığı üzerindeki etkileri*

Faktörler	Kallus Oluşumu (%)	Embriyojenik Kallus Oluşumu (%)	Kallus Boyutu (mm)	Kallus ağırlığı (mg)
Eksplant				
Skutellum	73.47^a	50.41^a	3.52^a	23.47 ^b
Yaprak	36.04 ^b	28.26 ^b	2.21 ^b	70.07^a
LSD (0.05)	3.08	3.06	0.20	6.75
F değeri	566.374	200.651	150.157	183.559
SE (+/-)	1.758	1.748	0.119	0.981
P r>F	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Genotip				
Ceyhan-99	57.08^a	46.66^a	2.97^a	63.80^a
Sarıçanak	55.83 ^{ab}	39.72 ^b	2.88^a	50.58 ^b
Svevo	52.08 ^{ab}	37.08 ^{bc}	2.77 ^a	35.82 ^c
Sagittario	54.02 ^b	33.88 ^c	2.83 ^a	36.86 ^c
LSD (0.05)	4.36	4.33	0.29	9.55
F değeri	1.920	12.080	0.614	14.724
SE (+/-)	1.243	1.236	0.084	0.694
P r>F	0.124	<0.000	0.605	<0.000
İndüksiyon ortamı				
1(kontrol)	8.43 ^d	0.00 ^f	0.36 ^d	8.41d
2	62.5 ^{ab}	56.25^a	3.20 ^b	57.07ab
3	53.75 ^c	42.81 ^{cd}	2.76 ^c	44.87bc
4	57.18 ^{bc}	46.56 ^{bc}	2.81 ^c	54.32ab
5	56.87 ^{bc}	34.68 ^c	2.87 ^c	42.96bc
6	65.00 ^a	38.43 ^{de}	3.84^a	63.13a
7	56.25 ^{bc}	33.12 ^e	3.06 ^{bc}	60.55a
8	64.68^a	52.18 ^{ab}	3.37 ^b	52.35ab
9	68.12^a	50.00 ^{ab}	3.48 ^b	37.22c
LSD (0.05)	6.54	6.50	0.44	14.32
F değeri	58.422	50.827	39.230	10.486
SE (+/-)	0.288	0.824	0.056	0.462
P r>F	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000
Önemlilik (P)				
Eksplant	***	***	***	***
Genotip	ÖD	***	ÖD	***
İnd. Ortamı	***	***	***	***
Genel ortalama	54.75	39.34	2.86	46.77

* LSD testi ile ayrılan ortalamaları karşılaştırmak için üç yönlü ANOVA kullanılmıştır. Bir sütun içinde farklı harfle ifade edilen ortalamalar p≤0.05 düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

Değişkenler arası ilişkilerin daha ayrıntılı bir şekilde anlaşılabilmesi için yapılan Fisher LSD post-hoc testi sonuçlarına göre; eksplant türünün kallus üretimini, embriyojenik kallus oranın, kallus boyutun ve kallus ağırlığın da önemli ölçüde

etkilediğini göstermiştir. Skutellum eksplantı (ortalama = 73.47) yaprak eksplantına (ortalama = 36.04) kıyasla yaklaşık iki kat daha fazla kallus oluşturmıştır. Benzer şekilde, embriyojenik kallus oluşumu yönünden eksplant tipleri arasında anlamlı bir fark oluşmuştur (LSD = 3.06). Skutellum eksplantı (ortalama = 50.41), yaprak eksplantına (ortalama = 28.26) kıyasla daha yüksek embriyojenik kallus meydana getirmiştir (Çizelge 4.14) (Şekil 4.8). Bu bulgular, skutellum eksplantının embriyojenik kallus oluşumuna daha olumlu katkı sağladığını ortaya koymaktadır.



Şekil 4.7. I. grup somatik embriyogenesis denemelerinde; (a) skutellum eksplantından elde edilen embriyojenik kallus, (b) yaprak eksplantından elde edilen embriyojenik kallus

Eksplant faktörü kallus boyutunu önemli ölçüde etkilenmiştir (LSD = 0.20). Skutellum eksplantı (ortalama = 3.52), yaprak eksplantına (ortalama = 2.21) kıyasla daha büyük kallus boyutları oluşturmıştır. İlginç bir şekilde, kallus ağırlığı için yapılan LSD testi, yaprak eksplantının skutellum eksplantına (ortalama = 23.47 mg) kıyasla (LSD = 3.447) oranla önemli ölçüde daha ağır kallus (ortalama = 70.07 mg) ürettiğini ortaya koymuştur (Çizelge 4.14) Bu, skutellum eksplantlarının kallus üretimi ve boyutu için daha başarılı olmasına rağmen, yaprak eksplantlarının daha fazla biyokütleyle sahip kalluslar oluşturduğunu göstermektedir.

Genotip faktörü açısından; en fazla kallus oluşumu Ceyhan-99 (ortalama = 57.08) ve en az kallus oluşumu Svevo (ortalama = 52.08) genotipinde belirlenmiştir. En fazla embriyojenik kallus üreten genotip de yine Ceyhan-99 (ortalama = 46.66) genotipi iken,

en az embriyojenik kallus üreten genotip Sagittario (ortalama = 33.88) olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, en ağır kallus oluşturan genotip Ceyhan-99 (ortalama = 63.80 mg) ve en hafif kallus oluşturan genotip Svevo (ortalama = 35.82mg) olarak bulunmuştur. Bununla birlikte, kallus büyüklüğü açısından genotipler arasında bir fark bulunmamıştır (Çizelge 4.14).

İndüksiyon ortamı faktörü yönünden kallus üretimi ve embriyojenik kallus üretimi farklı ortamlarda değişiklik göstermiştir. En yüksek kallus oluşumu %68.12 ortalama ile 9. ortamda kaydedilmişken, en düşük ortalama %53.75 ile 3. ortamda gerçekleşmiştir. Embriyojenik kallus oluşumu ise en yüksek %56.25 ortalama ile 2. ortamda, en düşük ise %33.12 ortalama ile 7. ortamda tespit edilmiştir. Kallus büyüklüğü açısından en büyük ortalama 3.84 mm ile 6. ortamda, en küçük ise ortalama 0.36 mm ile 1. ortamda ölçülmüştür. Kallus ağırlığı bakımından en yüksek ortalama 63.13mg ile 6. ortamda, en düşük ise ortalama 8.41 mg ile 1. ortamda (kontrol) belirlenmiştir (Çizelge 4.14).

Yukarıda belirtildiği gibi genotip faktörü tek başına kallus üretimi ve kallus boyutu üzerine önemli ölçüde bir etkiye sahip değildir. Bununla birlikte, genotip x eksplant ikili interaksyonu ($F=8.736$, $p < 9.13e-06$) ile genotip x ortam ikili interaksyonu ($F=2.229$, $P < 0.001$) kallus üretimi üzerine önemli bir etki oluşturmuştur (veri tabloda gösterilmemiştir). Benzer şekilde, kallus ağırlığı bakımından genotip x eksplant ikili interaksyonu ($F=10.130$, $p < 0.001$) ve genotip x ortam ikili interaksyonunun ($F=4.388$, $p < 0.001$) etkisi de önemli bulunmuştur (veri tabloda gösterilmemiştir). Bu sonuç, eksplant tipinin kallus üretimi ve kallus ağırlığı üzerindeki etkisinin genotipe bağlı olduğunu göstermektedir.

Bazı genotipler belirli bir eksplant tipinde daha iyi yanıt vermiştir ve bu yanıt kullanılan çeşitli ortamlara bağlı olarak değişmektedir yani eksplant x genotip x indüksiyon ortamı üçlü interaksyonu sonucu etkilemektedir. Bu etkiyi belirlemek üzere yapılan 3 yönlü varyans analizinde; eksplant x genotip x indüksiyon ortamı interaksyonunun kallus oluşumu ($F= 1.611$, $p = 0.03$), embriyojenik kallus oluşumu ($F= 4.715$, $P < 0.001$), kallus boyutu ($F= 1.884$, $P < 0.00$) ve kallus ağırlığı ($f= 3.671$, $P < 0.001$) üzerinde önemli etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.15, 4.16, 4.17 ve 4.18)

Çizelge 4.15. I. Grup somatik embriyogenesis denemelerinde eksplant x genotip x indüksiyon ortamı interaksiyonunun toplam kallus oluşumu (%) üzerine etkileri*

İndüksiyon Ortamı	İndüksiyon Ortamlarında Kallus Oluşumunun Gerçekleştiği Genotipler ve Eksplantları							
	Ceyhan-99		Sarıçanak		Svevo		Sagittario	
	Skutellum	Yaprak	Skutellum	Yaprak	Skutellum	Yaprak	Skutellum	Yaprak
1 (Kontrol)	12.5v-x	0.0x	50.0 k-q	0.0x	5.0wx	0.0x	0.0x	0.0x
2	97.5 a	37.5o-u	90.0a-c	42.5m-t	70.0d-j	35.0p-u	82.5a-e	45.0l-s
3	82.5 a-e	45.0l-s	75.0b-h	27.5s-v	65.0e-k	27.5 s-v	77.5b-g	30.0r-v
4	90.0a-c	30.0r-v	80.0a-f	35.0p-u	72.5c-i	25.0 t-v	87.5a-d	37.5o-u
5	80.0a-f	30.0r-v	70.0d-j	50.0k-q	72.5c-i	42.5m-t	65.0e-k	45.0 l-s
6	87.5a-d	60.0g-m	82.5a-e	40.0n-u	80.0a-f	57.5h-n	70.0d-j	42.5m-t
7	87.5a-d	35.0p-u	72.5c-i	37.5o-u	80.0 a-f	42.5m-t	55.0i-o	40.0n-u
8	92.5ab	37.5o-u	97.5a	22.5u-w	75.0b-h	47.5k-r	87.5a-d	57.5h-n
9	90.0a-c	32.5q-u	87.5a-d	45.0 l-s	87.5 a-d	52.5j-p	87.5a-d	62.5fl
LSD (0.05)		18.5						
F değeri		3.671						
SE (+/-)		0.287						
Pr>F		0.03						
Önemlilik (P)		*						
Genel ortalma		54.75						

* LSD testi ile ayrılan ortalamaları karşılaştırmak için üç yönlü ANOVA kullanılmıştır. Bir sütun içinde farklı harfle ifade edilen ortalamalar $p \leq 0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

Eksplant x genotip x indüksiyon ortamı arasındaki üçlü interaksiyonun kallus oluşumu üzerine etkileri Çizelge 4.15 de ortaya konulmuştur. Tüm uygulamalardaki genel kallus oluşumu ortalaması %54.75 olup, uygulamalar arasında büyük farklılıklar gözlenmektedir. Ceyhan-99 genotipinden alınan skutellum eksplantları 2. ortamda %97.5 ile en yüksek kallus oluşumunu verirken, Svevo genotipinden alınan skutellum eksplantları 1. ortamda %5 ile en düşük kallus oluşum oranına sahiptir (Çizelge 4.15).

Eksplant x genotip x indüksiyon ortamı arasındaki üçlü interaksiyonun embriyojenik kallus oluşumu üzerine etkileri Çizelge 4.16 da gösterilmiştir. Genel embriyojenik kallus oluşumu ortalaması %39.34 olmuş ve uygulamalar arasında farklılıklar bulunmuştur. Sarıçanak genotipinden alınan skutellum eksplantları 8. ortamda %97.5 ile en yüksek embriyojenik kallus oluşumunu sağlarken, aynı ortamda aynı genotipten alınan yaprak eksplantları %15 ile en düşük oranı vermiştir (Çizelge 4.16).

Çizelge 4.16. I. grup somatik embriyogenesis denemelerinde eksplant x genotip x indüksiyon ortamı interaksyonunun embriyojenik kallus oluşumu üzerine etkileri*

İndüksiyon Ortamı	İndüksiyon Ortamlarında Embriyojenik Kallusların Oluştığı Genotipler ve Eksplantları							
	Ceyhan-99		Sarıçanak		Svevo		Sagittario	
	Skutellum	Yaprak	Skutellum	Yaprak	Skutellum	Yaprak	Skutellum	Yaprak
1 (Kontrol)	0.0s	0.0s	0.0s	0.0s	0.0s	0.0s	0.0s	0.0s
2	92.5a	32.5l-r	90.0a	25.0o-r	70.0b-d	30.0m-r	80.0a-c	30.0m-r
3	82.5ab	37.5j-q	52.5d-k	27.5n-r	50.0e-l	22.5 p-r	42.5h-o	27.5-n-r
4	70.0b-d	25.0o-r	80.0a-c	32.5l-r	50.0e-l	20.0qr	65.0b-f	30.0-r
5	67.5d-e	20.0qr	62.5c-g	42.5h-o	32.5l-r	22.5p-r	0.0s	30.0-r
6	45.0g-n	42.5h-o	25.0-r	35.0k-q	80.0a-c	45.0g-n	0.0s	35.0k-q
7	55.0d-j	30.0m-r	0.0s	35.0k-q	45.0g-n	37.5j-q	27.5n-r	35.0k-q
8	92.5a	30.0m-r	97.5a	15.0rs	37.5j-q	40.0 i-p	57.5d-i	47.5f-m
9	90.0a	27.5n-r	65.0b-f	30.0m-r	50.0e-l	35.0kl-q	60.0d-h	42.5h-o
LSD (0.05)		18.39						
F değeri		4.715						
SE (+/-)		0.291						
Pr>F		<0.00						
Önemlilik (P)		***						
Genel ortalma		39.34						

* LSD testi ile ayrılan ortalamaları karşılaştırmak için üç yönlü ANOVA kullanılmıştır. Bir sütun içinde farklı harfle ifade edilen ortalamalar $p \leq 0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

Eksplant x genotip x indüksiyon ortamı arasındaki üçlü interaksyonun kallus boyutu üzerine etkileri Çizelge 4.17 de gösterilmiştir. Kallus boyutu ortalaması 2.86 mm olup, uygulamalar arasında çeşitlilik göstermektedir. Ceyhan-99 genotipinden alınan yaprak eksplantları 6. ortamda 5.08 mm ile en büyük kallus boyutunu oluştururken, Svevo genotipinden alınan skutellum eksplantları 1. ortamda 0.18 mm ile en küçük boyutta kalluslar oluşturmuştur (Çizelge 4.17).

Çizelge 4.17. I. grup somatik embriyogenesis denemelerinde eksplant x genotip x indüksiyon ortamı interaksiyonunun kallus boyutu (mm/eksplant) üzerine etkileri*

İndüksiyon Ortamı	İndüksiyon Ortamlarında Kallus Boyutlarının Oluştığı Genotipler ve Eksplantları							
	Ceyhan-99		Sarıçanak		Svevo		Sagittario	
	Skutellum	Yaprak	Skutellum	Yaprak	Skutellum	Yaprak	Skutellum	Yaprak
1 (Kontrol)	0.24v	0.00v	2.47m-s	0.00v	0.18v	0.00v	0.00v	0.00v
2	4.56a-e	2.27n-u	4.17a-f	2.87g-q	3.26f-o	1.53r-u	4.23a-f	2.74h-r
3	4.36a-f	2.31n-u	3.97a-h	1.64q-u	2.65j-r	1.58r-u	3.89a-j	1.69q-u
4	3.49c-n	1.14tv	3.86a-k	2.00p-u	3.77b-l	1.68q-u	4.42a-f	2.16o-u
5	3.93a-i	1.24s-v	3.26f-o	2.87g-q	3.52c-n	2.88g-q	2.64j-r	2.61k-r
6	4.66a-c	5.087a	4.02a-g	2.71i-r	3.85a-k	3.79b-l	4.00a-g	2.58l-r
7	4.55a-e	3.24f-p	3.78b-l	1.93q-u	3.37d-o	3.45c-n	2.39m-t	1.80q-u
8	4.83ab	1.79q-u	4.61a-d	1.094uv	3.21f-p	3.45c-n	4.64ac	3.35e-o
9	4.08a-g	1.64q-u	3.75b-l	2.86g-q	3.62b-m	4.09a-g	4.34a-f	3.48c-n
LSD (0.05)		1.25						
F değeri		1.884						
SE (+/-)		0.019						
Pr>F		<0.00						
Önemlilik (P)		***						
Genel ortalma		2.86						

* LSD testi ile ayrılan ortalamaları karşılaştırmak için iki yönlü ANOVA kullanılmıştır. Bir sütun içinde farklı harfle ifade edilen ortalamalar $p \leq 0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

Eksplant x genotip x indüksiyon ortamı arasındaki üçlü interaksiyonun kallus ağırlığı üzerine etkileri Çizelge 4.18 de verilmiştir. Genel kallus ağırlığı ortalaması 46.77 mg dır. Ceyhan-99 genotipinden alınan yaprak eksplantları 6. ortamda 192.36 mg ortalama ile en yüksek kallus ağırlığını meydana getirirken, Svevo genotipinden alınan skutellum eksplantları 1. ortamda 2.01 mg ortalama ile en hafif kallus ağırlığını vermiştir (Çizelge 4.18).

Çizelge 4.18. I. Grup somatik embriyogenesis denemelerinde eksplant x genotip x indüksiyon ortamı interaksiyonunun kallus ağırlığı (mg/eksplant) üzerine etkileri*

İndüksiyon Ortamı	İndüksiyon Ortamlarında Kallus Ağırlıklarının Oluştığı Genotipler ve Eksplantları							
	Ceyhan-99		Sarıçanak		Svevo		Sagittario	
	Skutellum	Yaprak	Skutellum	Yaprak	Skutellum	Yaprak	Skutellum	Yaprak
1 (Kontrol)	4.98tu	3.41u	11.44r-u	5.44s-u	2.01u	0.00u	0.00u	40.00f-u
2	23.16m-u	189.96a	31.42k-u	53.36e-q	10.81r-u	39.10g-u	33.55j-u	75.20c-i
3	36.05h-u	107.63c	18.32p-u	53.51e-p	19.84p-u	44.00e-t	26.02m-u	53.66e-p
4	39.41g-u	48.29e-r	27.68l-u	149.15b	11.65r-u	52.28e-q	28.79l-u	77.37c-g
5	16.99p-u	57.40d-p	20.05p-u	62.02d-n	21.75n-u	107.57c	21.75n-u	36.21h-u
6	34.92i-u	182.98ab	31.56k-u	75.83c-h	28.69l-u	70.15c-k	20.05p-u	60.93d-o
7	23.91m-u	192.364a	25.98m-u	96.46cd	20.67o-u	67.97c-l	16.99p-u	40.09f-u
8	25.58m-u	62.58d-m	79.96c-f	82.78c-e	22.00n-u	67.54c-l	25.58m-u	52.78e-q
9	26.59m-u	72.23c-j	24.19m-u	61.41d-n	12.92q-u	45.92e-s	19.67p-u	34.89i-u
LSD (0.05)		440.52						
F değeri		3.671						
SE (+/-)		0.163						
Pr>F		<0.000						
Önemlilik (P)		***						
Genel ortalma		46.77						

* LSD testi ile ayrılan ortalamaları karşılaştırmak için üç yönlü ANOVA kullanılmıştır. Bir sütun içinde farklı harfle ifade edilen ortalamalar p≤0.05 düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

4.2.1.2. Genotip, eksplant ve rejenerasyon ortamı faktörlerinin yeşil nokta oluşumu, rejenerant bitki oranı ve kallus başına sürgün sayısı üzerine etkileri

I. grup somatik embriyogenesis denemelerinde öncelikle 4 buğday genotipinin skutellum ve yaprak eksplantlarının her birisi temel besin ortamı Modifiye edilmiş MS ortamı olan ve 30 gr/L sukroz karbonhidrat kaynağı eklenmiş 9 farklı indüksiyon ortamında kültüre alınmıştır. Bu indüksiyon ortamlarında oluşan embriyojenik kalluslar rejenerare olabilmeleri için 2 farklı rejenerasyon ortamına (Çizelge 3.12) aktarılmış, daha sonra bunlardan oluşan yeşil nokta sayısı, kallus başına sürgün sayısı ve rejenerant bitki sayısı verileri kaydedilmiştir. Bu rejenerasyon denemelerinde eksplant tipi, genotip ve rejenerasyon ortamı faktörlerinin yeşil nokta sayısı, kallus başına sürgün sayısı ve rejenerant bitki sayısı üzerindeki etkilerini belirlemek için üç yönlü varyans analizi yapılmıştır (Çizelge 4.19).

Çizelge 4.19. I.grup somatik embriyogenesis denemelerinde genotip, eksplant ve rejenerasyon ortamının yeşil nokta sayısı, kallus başına sürgün sayısı ve rejenerant bitki

Faktörler	Kültüre Alınan Kallus Sayısı (adet)	Yeşil Nokta Sayısı (adet/kallus)	Kallus Başına Sürgün Sayısı (adet/kallus)	Rejenerant Bitki Sayısı (adet/kallus)
Eksplant Tipi				
Skutellum	1112	18,44	16.27a	3.30a
Yaprak	510	15,65	3.01b	0,54b
F value		1,345	12,599	13,85
Pr (>F)		0.24	<0.001	<0.001
SE (+/-)		0.601	0.934	0.185
Genotip				
Ceyhan-99	469	19.58a	17.97a	3.52a
Sarıçanak	402	21.27a	6.11b	1.27b
Svevo	366	14.66ab	8.33ab	1.61ab
Sagottiro	385	12.66b	6.16b	1.27b
fFvalue		0,04	2,283	2,118
Pr (>F)		2,83	0,082	0,101
SE (+/-)		0.425	0.660	0.131
Rejenerasyon Ortamı				
R1	795	18.68a	10,19	2.12a
R2	827	15.41a	9,09	1.72b
F value		0,17	0,086	0,294
Pr (>F)		1,83	0,769	0,588
SE (+/-)		0.601	0.934	0.185
Önemlilik (P)				
Eksplant		ÖD	***	***
Genotip		*	ÖD	ÖD
Rejenerasyon Ortamları		ÖD	ÖD	ÖD
Toplam	1622			
Genel ortalama		17,04	9,64	1,92

* LSD testi ile ayrılan ortalamaları karşılaştırmak için üç yönlü ANOVA kullanılmıştır. Bir sütun içinde farklı harfle ifade edilen ortalamalar $p \leq 0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

Çizelge 4.19' a göre eksplant tipi (skutellum ve yaprak) yeşil nokta oluşumu ($F=1.345$, $P=0.248$) üzerinde önemli bir etkiye sahip değilken, kallus başına sürgün sayısı üzerinde ($F=12.599$, $P<0.001$) ve rejenerant bitki sayısı üzerinde ($F=13.850$, $P<0.001$) önemli farklılık göstermektedir. Bu durum, kullanılan eksplant tipinin buğday somatik embriyogenesisinde yeşil nokta oluşumu, kallus başına sürgün sayısı ve rejenerant bitki oluşturma başarısını belirlemede kritik bir faktör olduğunu göstermektedir. Skutellum eksplantları yaprak eksplantına göre 5.4 kat daha fazla sürgün ve 3 kattan fazla rejenerant

bitki üretmiştir (Çizelge 4.19). Bu sonuç buğday bitkisinde skutellum eksplantının sürgün rejenerasyonu için daha başarılı bir kaynak olabileceğine işaret etmektedir.

Genotip faktörü; yeşil nokta oluşumu ($F= 2.830$, $P= 0.04$) üzerinde önemli etki göstermiştir. En fazla yeşil nokta 21.27 ortalama ile Sarıçanak genotipinde ve en az yeşil nokta 12.66 ortalama ile Sagittario genotipinde oluşmuştur. Ancak genotip faktörü kallus başına sürgün sayısı ($F= 2.283$, $P=0.082$) ve rejenerant bitki ($F= 2.118$, $P=0.101$) sayısı üzerinde önemli bir etkide bulunmamıştır (Çizelge 4.19).

Rejenerasyon ortamı faktörü; yeşil nokta oluşumu ($F= 1.839$, $P= 0.177$), kallus başına sürgün sayısı ($F= 0.086$, $P=0.569$) ve rejenerant bitki ($F= 0.294$, $P=0.588$) sayısı (Çizelge 4.19). üzerinde önemli bir farklılık oluşturmamıştır.

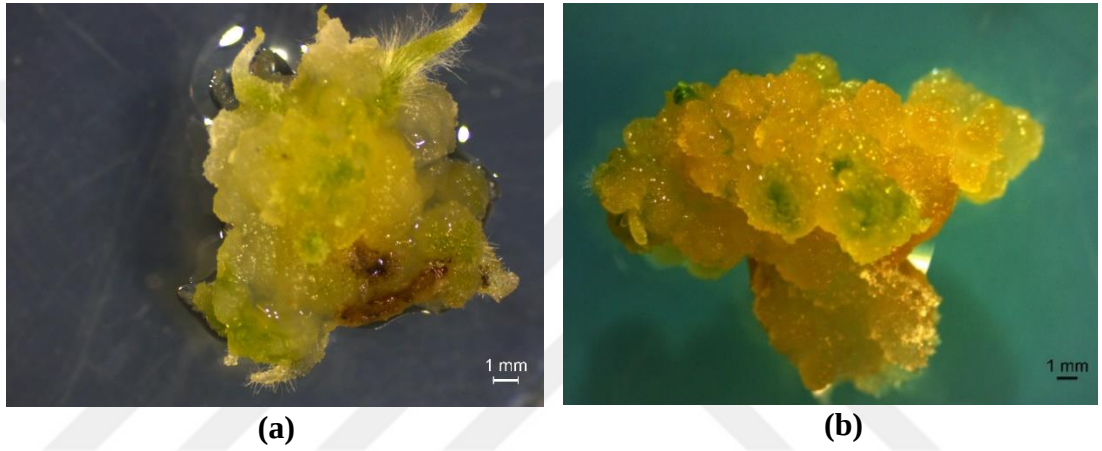
Çizelge 4.20. I.grup somatik embriyogenesis denemelerinde genotip x eksplant x rejenerasyon ortamı interaksiyonunun yeşil nokta, kallus başına sürgün ve rejenerant bitki üzerine etkileri*

Genotip	Eksplant	Yeşil Nokta Sayısı		Kallus başına Sürgün Sayısı		Rejenerant Bitki Sayısı	
		Rejenerasyon Ortamları					
		R1	R2	R1	R2	R1	R2
Ceyhan-99	Skutellum	27.33a	21.22a-c	41.77a	19.11b	8.11a	4.22ab
	Yaprak	12.22c	17.55a-c	1.88b	9.11b	0.33b	1.44b
Sarıçanak	Skutellum	12.22c	17.55a-c	9.77b	10.44b	2.11b	2.22b
	Yaprak	20.88a-c	21.00a-c	2.66b	1.55b	0.44b	0.33b
Svevo	Skutellum	18.66a-c	8.11c	11.77b	19.00b	2.66b	3.11b
	Yaprak	19.55a-c	12.33c	0,77b	1.77b	0.22b	0.44b
Sagittario	Skutellum	13.66a-c	15.33a-c	8.88b	9.44b	2.33b	1.66b
	Yaprak	11.11c	10.55c	4.00b	2.33b	0.77b	0.33b
LSD(0.05)		13,47		20,91		4,15	
F value		0,399		1.258		0.734	
Pr>F		0,753		0.291		0.533	
SEm(+/-)		0.212		0.065		0.330	
Önemlilik (P)		ÖD		ÖD		ÖD	
Genel Ortalama		17,048		9,64		1,92	

* LSD testi ile ayrılan ortalamaları karşılaştırmak için üç yönlü ANOVA kullanılmıştır. Bir sütun içinde farklı harfle ifade edilen ortalamalar $p \leq 0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

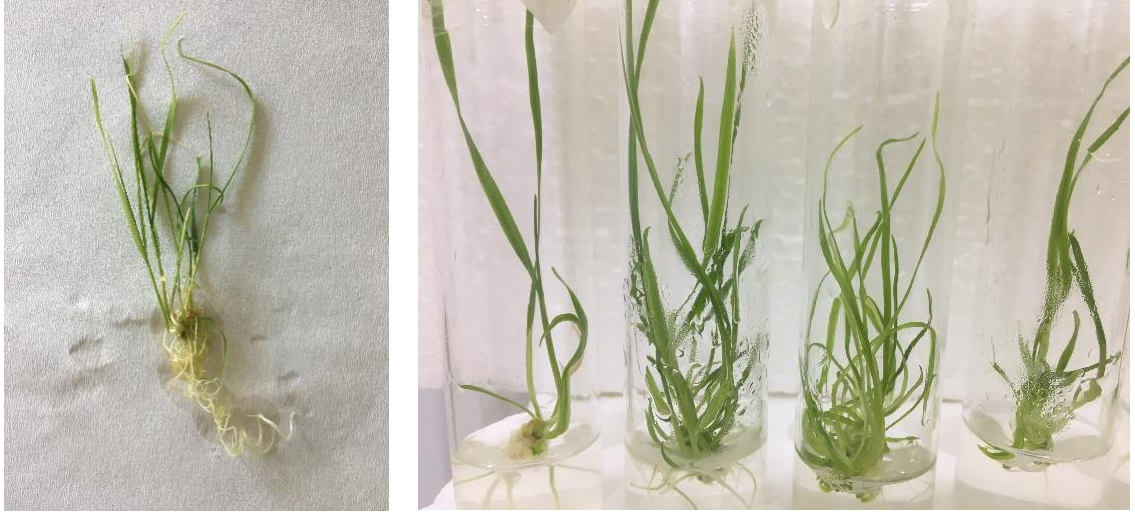
Eksplant tipi x genotip x rejenerasyon ortamı arasındaki üçlü interaksiyonun yeşil nokta sayısı kallus başına sürgün sayısı ve rejenerant bitki sayısı üzerine etkileri Çizelge 4.20 de verilmiştir.

Çizelge 4.20 ye göre, genel yeşil noktaların sayısı ortalaması 17.04 olup, uygulamalar arasında farklılıklar bulunmamaktadır ($F= 0.399$, $P=0.75$). Ceyhan-99 genotipinden alınan skutellum eksplantları 1. ortamda 27.33 ortalama ile en yüksek yeşil nokta oluşumunu sağlarken, Svevo genotipinden alınan skutellum eksplantları 2. ortamda 8.11 ortalama ile en düşük oranı vermiştir (Şekil 4.9).



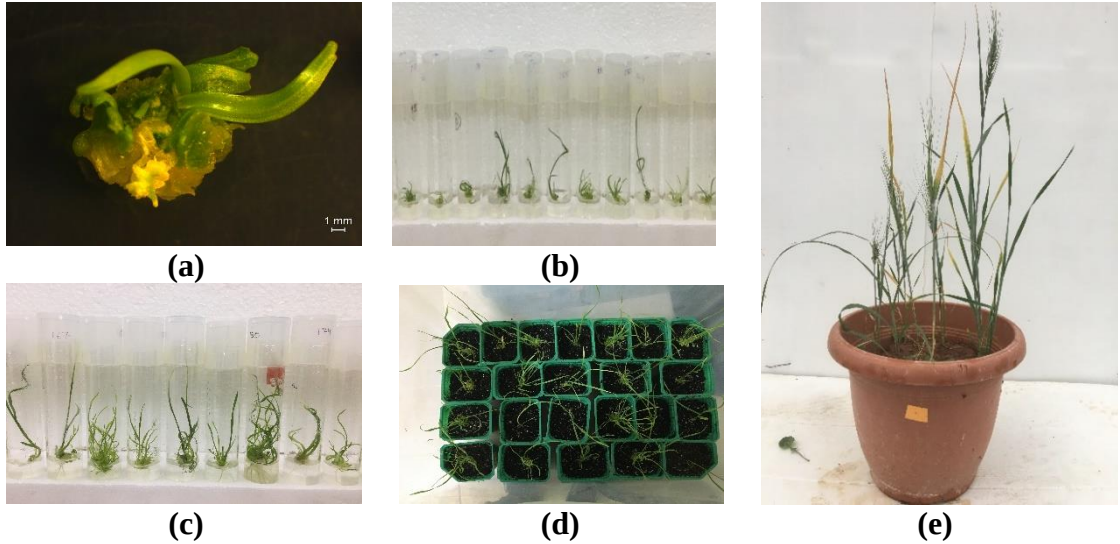
Şekil 4.8. I. grup somatik embriyogenesis denemelerinde; (a) skutellum eksplantından elde edilen yeşil noktalar, (b) yaprak eksplantından elde edilen yeşil noktalar.

Genel kallus başına sürgün sayısı ortalaması 9.64 olmuştur ve uygulamalar arasında farklılık bulunmamaktadır. Ceyhan-99 genotipinden alınan skutellum eksplantları 1. ortamda 41.77 ile en yüksek kallus başına sürgün sayısını oluştururken, Svevo genotipinden alınan skutellum eksplantları 1. ortamda 0.77 ortama ile en düşük kallus başına sürgün sayısını vermiştir (Çizelge 4.20) (Şekil 4.10).



Şekil 4.9. I. Grup somatik embriyogenesis denemelerinde kalluslardan oluşan sürgünler

Genel rejenerant bitki sayısı ortalaması 1.92 olup, varyans analizi sonuçlarına göre uygulamalar arasında farklılıklar bulunmamaktadır ($F=0.734$, $P=0.53$). Ceyhan-99 genotipinden alınan skutellum eksplantları 1. ortamda 8.11 adet ile en yüksek rejenerant bitki oluşumunu sağlarken, Svevo genotipinden alınan skutellum eksplantları yine 1. ortamda 0.22 en düşük oranı oluşuma neden olmuştur (Çizelge 4.20) (Şekil 4.11).



Şekil 4.10. I. grup somatik embriyogenesis denemelerinde; (a) embriyojenik kallustan rejenerasyon, (b, c) kök geliştirme ortamında gelişen rejenerant bitkicik, (d) bitkiciklerin toprağa aktarılması, (e) somatik embriyogenesisten oluşan fertil bitki.

4.2.2. II. Grup somatik embriyogenesis deneme bulguları

4.2.2.1. Genotip, eksplant ve indüksiyon ortamı faktörlerinin toplam kallus oluşumu, embriyojenik kallus oranı, kallus boyutu ve kallus ağırlığı üzerine etkileri

II. grup somatik embriyogenesis denemelerinde; 4 buğday genotipinin skutellum ve yaprak eksplantlarının her birisi temel besin ortamı Modifiye edilmiş MS ortamı olan ve 30 gr/L maltoz karbonhidrat kaynağı eklenmiş 9 farklı indüksiyon ortamında kültüre alınmıştır. Bu denemelerde eksplant tipi, genotip ve ortamların kallus oluşumu, embriyojenik kallus oranı, kallus boyutu ve kallus ağırlığı üzerindeki etkilerini belirlemek için üç yönlü varyans analizi yapılmıştır (Çizelge 4.21).

Çizelge 4.21' e göre eksplant skutellum ve yaprak parçası) faktörü; kallus oluşumu ($F= 810.9$, $P < 0.001$), embriyojenik kallus oranı ($F= 320.06$, $P < 0.001$), kallus boyutu ($F= 127.48$, $P < 0.01$) ve kallus ağırlığı ($F= 78.526$, $p < 0.001$) üzerinde oldukça önemli etkiye sahip bulunmuştur. Bu nedenle kullanılan eksplant tipinin buğday somatik embriyogenesisinde kallus oluşumu, embriyojenik kallus oluşumu, kallus boyutu ve kallus ağırlığı üzerinde kritik rolü olduğu ifade edilebilir. Skutellum eksplantları, yaprak eksplantına göre daha fazla kallus miktarı, embriyojenik kallus ve daha büyük kalluslar üretmiş ancak kallus ağırlığı yaprak eksplantında skutelluma göre iki kat yüksek olmuştur (Çizelge 4.21).

Genotip faktörü; kallus oluşumuna ($F= 12.11$, $P < 0.001$), kallus boyutuna ($F = 5.10$, $P < 0.01$), embriyojenik kallus oranına ($F= 5.06$, $p < 0.01$) ve kallus ağırlığına ($F= 11.301$, $P < 0.001$) oldukça önemli etkide bulunmuştur (Çizelge 4.21).

İndüksiyon ortamı faktörünün ise kallus üretimi ($F= 82.03$, $P < 0.001$), embriyojenik kallus oranı ($F= 53.78$, $P < 0.001$), kallus boyutu ($F= 44.94$, $P < 0.001$) ve kallus ağırlığı ($F= 11.44$, $P < 0.001$) üzerine oldukça önemli etkisi olmuştur (Çizelge 4.21).

Çizelge 4.21. II. Grup somatik embriyogenesis denemelerinde genotip, eksplant ve indüksiyon ortamının toplam kallus oluşumu, embriyojenik kallus oranı, kallus boyutu ve kallus ağırlığı üzerindeki etkileri*

Faktörler	Kallus Oluşumu (%)	Embriyojenik Kallus Oluşumu (%)	Kallus Boyutu (mm)	Kallus ağırlığı (mg)
Eksplant				
Skutellum	81.38a	61.66a	3.78a	27.54b
Yaprak	39.65b	32.63b	2.56b	56.61a
LSD (0.05)	2.87	3.18	0.21	6.44
F değeri	810.940	320.067	127.489	78.526
SE (+/-)	1.638	1.813	0.120	1.834
P r>F	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Genotip				
Ceyhan-99	63.19a	52.50a	3.49a	37.83b
Sarıçanak	66.25a	46.38b	3.22ab	28.66c
Svevo	55.13b	45.27b	2.94b	53.25a
Sagittario	57.50b	44.44b	3.03b	48.57a
LSD (0.05)	4.06	4.49	0.29	9.11
F değeri	12.114	5.068	5.102	11.301
SE (+/-)	1.158	1.282	0.084	1.297
P r>F	<0.001	<0.01	<0.01	<0.001
İndüksiyon ortamı				
1(kontrol)	7.50b	0.00c	0.31b	2.45d
2	66.56a	55.31ab	3.64a	51.73ab
3	68.75a	54.37ab	3.64a	51.06ab
4	67.81a	56.25a	3.51a	39.33ab
5	68.75a	52.18ab	3.69a	49.38a-c
6	65.93a	49.37b	3.65a	35.82c
7	66.25a	49.68ab	3.34a	38.68bc
8	66.87	55.00ab	3.45a	58.51a
9	66.25a	52.18ab	3.33a	51.69ab
LSD (0.05)	6.09	6.74	0.44	13.67
F değeri	82.032	53.781	44.949	11.446
SE (+/-)	0.772	0.855	0.056	0.864
P r>F	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Önemlilik (P)				
Eksplant	***	***	***	***
Genotip	***	**	**	***
İnd. Ortamı	***	***	***	***
Genel ortalama	60.52	47.15	3.17	37.38

* LSD testi ile ayrılan ortalamaları karşılaştırmak için üç yönlü ANOVA kullanılmıştır. Bir sütun içinde farklı harfle ifade edilen ortalamalar p<0.05 düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

Değişkenler arası ilişkilerin daha ayrıntılı şekilde ortaya konulması için yapılan Fisher LSD post-hoc testi sonuçlarına göre; eksplant tipi kallus üretimi, embriyojenik kallus oranı, kallus boyutu ve kallus ağırlığını önemli ölçüde etkilemiştir. Skutellum eksplantı (ortalama = 81.38) yaprak eksplantına (ortalama = 39.65) kıyasla yaklaşık 2 kat

daha fazla kallus üretmiştir. Benzer şekilde, LSD testi embriyojenik kallus oluşumu üzerine eksplant tipinin anlamlı bir fark oluşturduğunu göstermiştir (LSD = 3.18). Skutellum eksplantı (ortalama = 61.66), yaprak eksplantına (ortalama = 32.63) göre iki kat yüksek embriyojenik kallus oluşumu sağlamıştır (Çizelge 4.21).

Kallus boyutu yönünden skutellum eksplantı (ortalama = 3.78), yaprak eksplantına (ortalama = 2.56) kıyasla daha büyük kalluslar oluşturmuştur. İlginç bir şekilde, kallus ağırlığı için yapılan LSD testi, yaprak eksplantlarının (ortalama = 56.61) skutellum eksplantlarına kıyasla (ortalama = 27.54, LSD =6.44) önemli ölçüde daha ağır kalluslar ürettiğini ortaya koymuştur. Bu durum, tıpkı I. grup somatik embriyogenesis sonuçlarında olduğu gibi skutellum eksplantlarının kallus üretimi ve boyutu açısından daha başarılı olmasına karşılık, yaprak eksplantlarının daha fazla biyokütleyle sahip kalluslar oluşturduğunu ortaya koymuştur (Çizelge 4.21).

Genotip faktörü; farklı seviyelerde kallus üretimi oluşturmuştur. En fazla kallus üreten genotip Sarıçanak (ortalama = 66.25) ve en az kallus üreten Svevo (ortalama = 55.13) genotipleridir. En fazla embriyojenik kallus üreten genotip Ceyhan-99 (ortalama = 52.50) iken, en az üreten ise Sagittario (ortalama = 44.40) olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, en büyük kallus üreten genotip Ceyhan-99 (ortalama = 3.49) ve en küçük kallus üreten Svevo (ortalama = 2.94) genotipleri iken, en ağır kallus üreten genotip Svevo (ortalama = 53.25) ve en hafif kallus üreten Sarıçanak genotipi (ortalama = 28.66) olmuştur (Çizelge 4.21).

İndüksiyon ortamı faktörü açısından; en yüksek kallus üretimi %68.75 ortalama ile 3. ve 5. ortamlarda kaydedilmişken, en düşük kallus üretimi %7.5 ortalama ile 1. ortamda gerçekleşmiştir. Embriyojenik kallus üretimi ise en yüksek %56.25 ortalama ile 4. ortam, en düşük ise %49.37 ortalama ile 6. ortamda tespit edilmiştir, Kallus büyüklüğü açısından en büyük ortalama 3.69 mm ile 5. ortamda, en küçük kallus ise ortalama 0.31 mm ile 1. ortamda ölçülmüştür. Kallus ağırlığı bakımından en yüksek ortalama 58.51 mg ile 8. ortamda, en düşük ise ortalama 2.45 mg ile 1. ortamda belirlenmiştir (Çizelge 4.21).

Eksplant tipi x genotip x indüksiyon ortamı arasındaki üç yönlü interaksiyona gelince; bu üçlü etkileşim kallus üretimi $F= 1.69$, $P< 0.05$), embriyojenik kallus oranı ($F= 1.79$, $P<0.01$), kallus boyutu ($F= 1.79$, $P<0.05$), ve kallus ağırlığını ($F= 2.797$, $P <0.001$) üzerinde önemli fark oluşturmuştur (Çizelge 4.22).

Çizelge 4.22. II. Grup somatik embriyogenesis denemelerinde eksplant x genotip x indüksiyon ortamı interaksyonunun toplam kallus oluşumu üzerine etkileri*

İndüksiyon Ortamı	İndüksiyon Ortamlarında Kallus Oluşumunun Gerçekleştiği Genotipler ve Eksplantları							
	Ceyhan-99		Sarıçanak		Svevo		Sagittario	
	Skutellum	Yaprak	Skutellum	Yaprak	Skutellum	Yaprak	Skutellum	Yaprak
1 (Kontrol)	12.5mn	0.0n	47.5g-k	0.0 n	0.0n	0.0n	0.0n	0.0n
2	95.0a-c	27.5lm	95.0a-c	60.0fg	82.5b-e	42.5h-l	92.5a-d	37.5j-l
3	95.0a-c	42.5h-l	95.0a-c	60.0fg	80.0c-e	40.0i-l	92.5a-d	45.0g-k
4	100 a	42.5h-l	97.5ab	57.5f-h	77.5de	40.0i-l	87.5ad	40.0i-l
5	100 a	37.5j-l	97.5ab	42.5h-l	87.5a-d	52.5g-j	82.5b-e	50.0g-k
6	95.0a-c	55.0 f-i	100a	37.5j-l	70.0ef	42.5h-l	80.0c-e	47.5g-k
7	95.0a-c	52.5g-j	90.0a-d	45.0g-k	77.5de	47.5g-k	87.5a-d	35.0kl
8	100.a	50.0g-k	92.5a-d	40.0i-l	87.5a-d	35.0kl	87.5 a-d	42.5h-l
9	97.5 ab	40.0i-l	90.0a-d	45.0g-k	80.0c-e	50.0g-k	82.5b-e	45.0g-k
LSD (0.05)		17.24						
F değeri		1.694						
SE (+/-)		0.273						
Pr>F		<0.05						
Önemlilik (P)		*						
Genel ortalma		60.52						

* LSD testi ile ayrılan ortalamaları karşılaştırmak için üç yönlü ANOVA kullanılmıştır. Bir sütun içinde farklı harfle ifade edilen ortalamalar $p \leq 0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

Eksplant tipi x genotip x indüksiyon ortamı interaksyonu kallus oluşumunu önemli ölçüde etkilemiştir. Tüm uygulamalardaki genel kallus oluşumu ortalaması % 60.52 olup, uygulamalar arasında büyük farklılıklar gözlenmiştir. Ceyhan-99 genotipinden alınan skutellum eksplantları 4. ortamda %100 ile en yüksek kallus oluşumunu sağlarken, 1. (Kontrol) ortamda aynı genotipten alınan skutellum eksplantları % 12.5 ile en düşük kallus oluşum oranını vermiştir (Çizelge 4.22).

Eksplant x genotip x indüksiyon ortamı arasındaki üçlü interaksyonun embriyogenik kallus oluşumu üzerine etkileri Çizelge 4.22’ de gösterilmiştir. Genel embriyogenik kallus oluşumu ortalaması %47.15 olmuştur ve uygulamalar arasında farklılıklar oluşmuştur. Ceyhan-99 genotipinden alınan skutellum eksplantları 8. ortamda %100 ile en yüksek embriyogenik kallus oluşumunu gösterirken, aynı genotipten alınan yaprak eksplantları 2. ortamda % 15 ile en düşük oranı vermiştir (Çizelge 4.23).

Çizelge 4.23. II. Grup somatik embriyogenesis denemelerinde eksplant x genotip x indüksiyon ortamı interaksiyonunun embriyojenik kallus oluşumu üzerine etkileri*

İndüksiyon Ortamı	İndüksiyon Ortamlarında Embriyojenik Kallusların Oluştığı Genotipler ve Eksplantları							
	Ceyhan-99		Sarıçanak		Svevo		Sagittario	
	Skutellum	Yaprak	Skutellum	Yaprak	Skutellum	Yaprak	Skutellum	Yaprak
1 (Kontrol)	0.0p	0.0p	0.0p	0.0p	0.0p	0.0p	0.0p	0.0p
2	77.5 b-f	15.0p	65.0e-i	50.0h-l	85.0 a-d	40.0k-n	82.5a-e	27.5 no
3	70.0 c-g	35.0 k-n	77.5c-f	45.0j-n	75.0 c-f	35.0k-n	75.0c-f	35.0 k-n
4	77.5 b-f	35.0k-n	82.5a-e	45.0j-n	72.5c-f	32.5l-o	67.5d-h	37.5 k-n
5	70.0 cg	30.0m-o	77.5b-f	37.5 k-n	72.5 c-f	40.0k-n	47.5i-m	42.5 k-n
6	95.0 ab	45.0j-n	42.5 k-n	32.5l-o	47.5i-m	37.5 k-n	50.0 h-l	45.0j-n
7	87.5a-c	52.5gk	30.0m-o	32.5 l-o	65.0 e-i	40.0k-n	62.5 f-j	27.5 no
8	100. a	40.0 k-n	77.5 b-f	27.5 no	52.5g-k	35.0k-n	70.0c-g	37.5 k-n
9	82.5a-e	32.5l-o	77.5 b-f	35.0k-n	47.5i-m	37.5k-n	70.0c-g	35.0 k-n
LSD (0.05)		19.08						
F değeri		2.028						
SE (+/-)		0.302						
Pr>F		<0.01						
Önemlilik (P)		**						
Genel ortalma		47.15						

* LSD testi ile ayrılan ortalamaları karşılaştırmak için üç yönlü ANOVA kullanılmıştır. Bir sütun içinde farklı harfle ifade edilen ortalamalar p<0.05 düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

Eksplant x genotip x indüksiyon ortamı arasındaki üçlü interaksiyonun kallus boyutu üzerine etkileri Çizelge 4.23 de gösterilmiştir. Kallus boyutu ortalaması 3.17 mm olup, Ceyhan-99 genotipinden alınan yaprak eksplantları 6. ortamda 5.54 mm ile en büyük kallus boyutunu oluştururken, Ceyhan-99 genotipinden alınan skutellum eksplantları tepki veren ortamlar arasından 1. ortamda (kontrolde) 0.24 mm ile en küçük kallus boyutunu oluşturmuştur (Çizelge 4.24).

Eksplant x genotip x indüksiyon ortamı arasındaki üçlü interaksiyonun kallus ağırlığı üzerine etkileri Çizelge 4.25 de verilmiştir. Genel kallus ağırlığı ortalaması 42.07 mg olarak belirlenmiştir. Svevo genotipinden alınan yaprak eksplantları 5. ortamda 181.38 mg ile en yüksek kallus ağırlığını oluştururken, Svevo genotipinden alınan yaprak eksplantları 1. ortamda 3.25 mg ile en hafif kallus ağırlığını vermiştir (Çizelge 4.25).

Çizelge 4.24. II. Grup somatik embriyogenesis denemelerinde eksplant x genotip x indüksiyon ortamı interaksiyonunun kallus boyutu üzerine etkileri*

İndüksiyon Ortamı	İndüksiyon Ortamlarında Kallus Boyutlarının Oluştığı Genotipler ve Eksplantları							
	Ceyhan-99		Sarıçanak		Svevo		Sagittario	
	Skutellum	Yaprak	Skutellum	Yaprak	Skutellum	Yaprak	Skutellum	Yaprak
1 (Kontrol)	0.24y	0.00y	2.26v-x	0.00y	0.00y	0.00y	0.00y	0.00y
2	4.57a-g	1.65x	4.07b-n	3.63e-t	4.26b-l	3.43f-v	4.79a-e	2.70p-x
3	4.70a-e	2.50r-x	4.51a-h	3.34g-w	4.31a-j	2.58q-x	4.81a-e	2.38t-x
4	5.23ab	2.43s-x	4.50a-h	3.64e-t	4.04b-o	2.78o-x	2.85n-x	2.62p-x
5	5.05a-c	2.33u-x	5.07a-c	2.68p-x	4.62a-f	3.67d-s	3.36g-w	2.73p-x
6	5.54a	4.30a-k	3.86c-p	2.55q-x	2.95m-w	3.22i-w	3.72d-r	3.02l-w
7	4.91a-d	3.58e-u	3.11j-w	2.65p-x	2.79o-x	3.38f-w	4.16b-m	2.13wx
8	4.81a-e	3.81c-q	3.56e-u	2.58q-x	2.54r-x	2.13wx	5.54a	2.64p-x
9	4.43a-i	2.78p-x	3.62e-t	2.39t-x	3.04k-w	3.26h-w	4.26b-l	2.82n-x
LSD (0.05)		1.26						
F değeri		1.796						
SE (+/-)		0.020						
Pr>F		<0.05						
Önemlilik (P)		*						
Genel ortalma		3.17						

* LSD testi ile ayrılan ortalamaları karşılaştırmak için üç yönlü ANOVA kullanılmıştır. Bir sütun içinde farklı harfle ifade edilen ortalamalar $p \leq 0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

Çizelge 4.25. II. Grup somatik embriyogenesis denemelerinde eksplant x genotip x indüksiyon ortamı interaksiyonunun kallus ağırlığı üzerine etkileri*

İndüksiyon Ortamı	İndüksiyon Ortamlarında Kallus Ağırlıklarının Oluştığı Genotipler ve Eksplantları							
	Ceyhan-99		Sarıçanak		Svevo		Sagittario	
	Skutellum	Yaprak	Skutellum	Yaprak	Skutellum	Yaprak	Skutellum	Yaprak
1 (Kontrol)	4.98u-w	0.00w	11.44t-w	0.00w	0.00w	3.25vw	0.00w	0.00w
2	23.92o-w	34.68i-w	26.33m-w	42.04h-u	32.22j-w	46.24f-t	41.62h-v	52.18f-r
3	66.90e-k	40.15h-v	25.05n-w	65.40e-l	28.45k-w	52.29f-r	37.42h-w	92.88de
4	40.20h-v	42.63g-u	22.41p-w	17.42q-w	36.23i-w	64.59e-m	39.040h-v	52.18f-r
5	29.32j-w	38.15h-w	25.03n-w	22.63p-w	19.15q-w	181.38a	27.20l-w	52.23f-r
6	28.37k-w	29.96j-w	25.12n-w	20.74q-w	26.53m-w	55.79e-q	38.72h-v	61.36e-o
7	28.35k-w	32.32j-w	12.73s-w	51.30f-s	24.35o-w	81.34d-f	11.45t-w	67.66e-j
8	76.01e-h	73.23e-i	22.70p-w	63.35e-n	16.81r-w	118.21cd	16.85r-w	80.97d-g
9	38.99h-v	52.82f-r	20.81q-w	41.40h-v	38.54h-w	133.16bc	28.25l-w	59.61e-p
LSD (0.05)		38.65						
F değeri		2.797						
SE (+/-)		0.305						
Pr>F		<0.001						
Önemlilik (P)		***						
Genel ortalma		42.07						

* LSD testi ile ayrılan ortalamaları karşılaştırmak için iki yönlü ANOVA kullanılmıştır. Bir sütun içinde farklı harfle ifade edilen ortalamalar $p \leq 0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

4.2.2.2. Genotip, eksplant ve indüksiyon ortamı faktörlerinin yeşil nokta oluşumu, rejenerant bitki oranı ve kallus başına sürgün sayısı üzerine etkileri

II. grup somatik embriyogenesis denemelerinde öncelikle 4 buğday genotipinin skutellum ve yaprak eksplantlarının her birisi temel besin ortamı Modifiye edilmiş MS ortamı olan ve 30 gr/L maltoz karbonhidrat kaynağı eklenmiş 9 farklı indüksiyon ortamında kültüre alınmıştır. Bu indüksiyon ortamlarında oluşan embriyojenik kalluslar rejenerant olabilmeleri için 2 farklı rejenerasyon ortamına (Çizelge 3.12) aktarılmış, daha sonra bunlardan oluşan yeşil nokta sayısı, kallus başına sürgün sayısı ve rejenerant bitki sayısı verileri kaydedilmiştir. Bu rejenerasyon denemelerinde eksplant tipi, genotip ve rejenerasyon ortamı faktörlerinin yeşil nokta sayısı, kallus başına sürgün sayısı ve rejenerant bitki sayısı üzerindeki etkilerini belirlemek için üç yönlü varyans analizi yapılmıştır (Çizelge 4.26).

Çizelge 4.26 ya göre eksplant tipi (skutellum ve yaprak); yeşil nokta oluşumu ($F=45.25$, $P < 0.001$), kallus başına sürgün sayısı ($F=18.40$, $P < 0.001$) ve rejenerant bitki ($F=18.06$, $P < 0.001$) oluşumu üzerinde önemli farklılık göstermektedir. Genotip faktörü sadece rejenerant bitki ($F=3.286$, $P < 0.05$) oluşumu üzerinde önemli farklılığa sahiptir. Rejenerasyon ortamı faktörü ise ölçülen parametrelerde önemli bir fark oluşturmamıştır. LSD testine göre, kullanılan eksplant tipi buğday somatik embriyogenesisinde yeşil nokta oluşumu, kallus başına sürgün sayısı ve rejenerant bitki oranı başarısını belirlemede kritik bir faktördür. Skutellum eksplantları yaprak eksplantlarına göre 2.36 kat fazla yeşil nokta, 15.25 kat fazla kallus başına sürgün ve 6.67 kat rejenerant bitki üretmiştir (Çizelge 4.26).

Çizelge 4.26. II. grup somatik embriyogenesis denemelerinde genotip, eksplant ve rejenerasyon ortamının yeşil nokta sayısı, kallus başına sürgün sayısı ve rejenerant bitki sayısı üzerine etkileri*

Faktörler	Kültüre Alınan Kallus Sayısı (adet)	Yeşil Nokta Sayısı	Kallus Başına Sürgün Sayısı	Rejenerant Bitki Sayısı
Eksplant Tipi				
Skutellum	1171	27.97a	11.59a	2.20a
Yaprak	571	11.84a	0.76b	0.33b
LSD(0.05)		4.74	4.99	0.87
F value		45.25	18.40	18.06
Pr (>F)		<0.001	<0.001	<0.001
SE (+/-)		0.599	0.745	0.110
Genotip				
Ceyhan-99	545	17.66a	7.38ab	1.63a
Sarıçanak	477	19.13a	0.77b	0.11b
Svevo	397	22.44a	7.55ab	1.41a
Sagittario	414	20.38a	9.00a	1.91a
LSD(0.05)		6.70	7.05	1.23
F value		0.712	2.11	3.28
Pr (>F)		0.54	0.10	<0.05
SE (+/-)		0.423	0.527	0.078
Rejenerasyon Ortamı				
R1	866	19.65a	6.95a	1.37a
R2	876	20.16a	5.40a	1.16a
LSD(0.05)		4.74	4.99	0.87
F value		0.045	0.380	0.223
Pr (>F)		0.81	0.53	0.63
SE (+/-)		0.599	0.745	0.110
Önemlilik (P)				
Eksplant		***	***	***
Genotip		ÖD	ÖD	*
Rejenerasyon Ortamları		ÖD	ÖD	ÖD
Genel ortalama		19.90	6.18	1.27

* LSD testi ile ayrılan ortalamaları karşılaştırmak için üç yönlü ANOVA kullanılmıştır. Bir sütun içinde farklı harfle ifade edilen ortalamalar p≤0.05 düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

Eksplant x genotip x rejenerasyon ortamı arasındaki üçlü interaksiyonun yeşil nokta sayısı, kallus başına sürgün sayısı ve rejenerant bitki sayısı üzerine etkileri Çizelge 4.27 de verilmiştir.

Çizelge 4.27. II. grup somatik embriyogenesis denemelerinde genotip x eksplant x rejenerasyon ortamı interaksiyonunun yeşil nokta, kallus başına sürgün ve rejenerant bitki üzerine etkileri*

Genotip	Eksplant	Yeşil Nokta Sayısı		Kallus başına Sürgün Sayısı		Rejenerant Bitki Sayısı	
		Rejenerasyon Ortamları					
		R1	R2	R1	R2	R1	R2
Ceyhan-99	Skutellum	25.66ab	25.88ab	16.55ab	10.66a-e	3.44a	1.88a-c
	Yaprak	9.66c	9.44c	1.44de	0.88e	0.66c	0.55c
Sarıçanak	Skutellum	29.77a	27.88a	1.11de	2.00c-e	0.22c	0.22c
	Yaprak	8.55c	10.33c	0.00e	0.00e	0.00c	0.00c
Svevo	Skutellum	30.11a	26.77ab	15.77a-c	11.33a-e	2.33a-c	2.22a-c
	Yaprak	14.00bc	18.88a-c	0.33e	2.77b-e	0.22c	0.88bc
Sagittario	Skutellum	29.00a	28.66a	20.22a	15.11a-d	4.00a	3.33ab
	Yaprak	10.44c	13.44bc	0.22e	0.44e	0.11c	0.22c
LSD(0.05)		13.41		14.13		2.46	
F value		0.137		0.117		0.112	
Pr>F		0.93		0.95		0.95	
SEm(+/-)		0.211		0.263		0.039	
Önemlilik (P)		ÖD		ÖD		ÖD	
Genel Ortalama		19.90		6.16		1.27	

* LSD testi ile ayrılan ortalamaları karşılaştırmak için üç yönlü ANOVA kullanılmıştır. Bir sütun içinde farklı harfle ifade edilen ortalamalar $p \leq 0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

Çizelge 4.27 ye göre; eksplant tipi x genotip x rejenerasyon ortamı arasındaki üç yönlü interaksiyon ölçülen parametreler üzerinde önemli bir fark oluşturmamıştır. Bununla birlikte, en yüksek yeşil nokta sayısı, ortalama 30.11 ile Svevo genotipinin R1 ortamında kültüre alınan skutellum eksplantlarından üretilmiştir. Buna karşılık, en düşük yeşil nokta sayısı ortalama 8.55 ile Sarıçanak genotipinin R1 ortamında kültüre alınan yaprak eksplantlarında gerçekleşmiştir. Bu sonuç, aynı rejenerasyon ortamı koşulları altında genotip ve eksplant tipi seçiminin yeşil nokta üretiminde kritik bir rol oynadığını göstermektedir.

Ayrıca, en yüksek rejenerant bitki sayısı 4 ortalama ile Sagittario genotipi tarafından R1 ortamında skutellum eksplantları ile üretilmiştir. En düşük rejenerant bitki sayısı ise 0.11 ortalama ile aynı genotip tarafından R1 ortamında kültüre alınan yaprak eksplantlarında oluşmuştur. Kallus başına sürgün üretimi ile ilgili olarak, en yüksek

ortalama 20.22 ile Sagittario genotipinden R1 ortamında kültüre alınan skutellum eksplantlarından elde edilmiştir. Buna karşılık, en düşük ortalama 0.22 aynı genotipin aynı ortamda kültüre alınan yaprak eksplantlarında oluşmuştur. (Çizelge 4.27). Bu bulgular, genotip ve eksplant tipinin hem kallus başına sürgün üretimi hem de rejenerant bitki sayısı üzerindeki önemli etkisini ortaya koymakta ve buğdayda somatik embriyogenesis protokollerinin optimize edilmesindeki öneminin altını çizmektedir.

4.2.3. III. Grup somatik embriyogenesis deneme bulguları

4.2.3.1. Genotip, eksplant ve indüksiyon ortamı faktörlerinin toplam kallus oluşumu, embriyojenik kallus oranı, kallus boyutu ve kallus ağırlığı üzerine etkileri

III. grup somatik embriyogenesis denemelerinde; 4 buğday genotipinin skutellum ve yaprak eksplantlarının her birisi temel besin ortamı Modifiye edilmiş CHB ortamı [CHB-3 ortamı (Chu vd. 1990)] olan ve 30 gr/L sukroz karbonhidrat kaynağı eklenmiş 9 farklı indüksiyon ortamında kültüre alınmıştır. Bu denemelerde eksplant tipi, genotip ve ortamın kallus oluşumu, embriyojenik kallus oranı, kallus boyutu ve kallus ağırlığı üzerindeki etkilerini belirlemek için üç yönlü varyans analizi yapılmıştır (Çizelge 4.28).

Çizelge 4.28' e göre eksplant tipi faktörü, 690.548 F değeri ve 0.001 den küçük P değeri ile oldukça önemli etkiler göstererek iki eksplant (skutellum ve yaprak) arasında kallus oluşumunda önemli farklılık ortaya koymuştur. Genotip faktörü de kallus oluşumunu önemli ölçüde etkilemiştir. Bu faktörün F değeri 21.308 ve P değeri <0.001 olup 4 genotip arasında önemli farklılıklar sergilemiştir. İndüksiyon ortamı faktörünün F değeri 64,885 ve P değeri 0.001 den küçük olup, kullanılan 9 farklı ortam arasında kallus oluşumunda önemli bir varyasyon ortaya koymuştur (Çizelge 4.28). Kallus oluşumu yönünden eksplantların LSD değeri 2.94 olup, skutellum eksplantı (ortalama = 73.54) yaprak eksplantına (ortalama = 34.02) kıyasla önemli ölçüde daha yüksek kallus üretmiştir. Genotiplerin LSD değeri 4.169 olup en yüksek kallus üretimi Ceyhan-99 genotipinde (ortalama = 59.86) kaydedilmişken, en düşük kallus üretimi Svevo genotipinde (ortalama = 46.52) kaydedilmiştir. İndüksiyon ortamları için LSD değeri 6.25 olup, en yüksek kallus üretimi 8. ortamda (ortalama = 66.5625) ve en düşük kontrol ortamında (ortalama = 7) gerçekleşmiştir (Çizelge 4.28).

Çizelge 4.28. III. Grup somatik embriyogenesis denemelerinde genotip, eksplant ve indüksiyon ortamının toplam kallus oluşumu, embriyojenik kallus oranı, kallus boyutu ve kallus ağırlığı üzerindeki etkileri*

Faktörler	Kallus Oluşumu (%)	Embriyojenik Kallus Oluşumu (%)	Kallus Boyutu (mm)	Kallus Ağırlığı (mg)
Eksplant				
Skutellum	73.54a	31.94a	3.39a	23.86b
Yaprak	34.02b	28.54b	2.33b	70.68a
LSD (0.05)	2.94	3.05	0.20	7.76
F değeri	690.548	4.779	101.592	142.429
SE (+/-)	1.681	1.740	0.117	2.209
P r>F	<0.001	<0.05	<0.001	<0.001
Genotip				
Ceyhan-99	59.86a	32.77a	3.33a	45.34b
Sarıçanak	59.58a	27.22b	2.94b	39.08b
Svevo	46.52b	24.16b	2.21c	34.52b
Sagittario	49.16b	36.80a	2.94b	70.13a
LSD (0.05)	4.16	4.31	0.29	10.97
F değeri	21.308	13.145	20.148	16.124
SE (+/-)	1.188	1.230	0.082	1.562
P r>F	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
İndüksiyon ortamı				
1(kontrol)	7.5c	0.0e	0.31e	2.05d
2	55.31b	37.5b	2.95cd	58.30a-c
3	62.81a	34.06bc	3.69ab	46.56.bc
4	55.31b	27.18d	3.29bc	41.94c
5	65.56a	46.56a	3.16c	49.29bc
6	51.25b	39.06b	2.56d	71.15a
7	55.93b	29.06cd	2.63d	62.37a
8	66.56a	30.93cd	3.36a-c	50.53bc
9	64.00a	27.81cd	3.16c	43.21c
LSD (0.05)	6.25	6.47	0.43	16.46
F değeri	64.885	30.799	43.857	10.752
SE (+/-)	0.792	0.820	0.055	1.041
P r>F	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Önemlilik (P)				
Eksplant	***	*	***	***
Genotip	***	***	***	***
İnd. Ortamı	***	***	***	***
Genel ortalama	53.78	3.24	2.86	47.27

* LSD testi ile ayrılan ortalamaları karşılaştırmak için üç yönlü ANOVA kullanılmıştır. Bir sütun içinde farklı harfle ifade edilen ortalamalar $p \leq 0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

Embriyojenik kallus üretimi yönünden; eksplant faktörünün F-değeri 4.779, P-değeri <0.05 ve LSD değeri 3.05 bulunmuştur. En yüksek embriyojenik kallus üretimi skutellum eksplantında (ortalama = 31.94) gerçekleşirken, yaprak eksplantı 28.54 ortalama ile daha az embriyojenik kallus üretebilmiştir. En yüksek embriyojenik kallus üretimi Sagittario genotipinde (ortalama = 36.80), en düşük ise Svevo genotipinde (ortalama = 24.16) kaydedilmiştir.

İndüksiyon ortamı faktörünün embriyojenik kallus oluşturma yönünden F-değeri 30.799, P-değeri < 0.001 ve LSD değeri 6.47 olup, ortamın etkisi de önemli bulunmuştur. En yüksek embriyojenik kallus üretimi ortam 5'te (ortalama = 46.56), en düşük ise ortam 4'te (ortalama = 27.18) kaydedilmiştir (Çizelge 4.28).

Eksplant x genotip x indüksiyon ortamı interaksyonunun etkisini ortaya koymak için yapılan 3 yönlü varyans analizinde ise üçlü interaksyon 3.091 F değeri ve <0.001 P değeri ile anlamlı olup, bir faktörün etkisinin diğer faktörlerin seviyelerine bağlı olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.29. III. Grup somatik embriyogenesis denemelerinde eksplant x genotip x indüksiyon ortamı interaksyonunun toplam kallus oluşumu üzerine etkileri*

İndüksiyon Ortamı	İndüksiyon Ortamlarında Kallus Oluşumunun Gerçekleştiği Genotipler ve Eksplantları							
	Ceyhan-99		Sarıçanak		Svevo		Sagittario	
	Skutellum	Yaprak	Skutellum	Yaprak	Skutellum	Yaprak	Skutellum	Yaprak
1 (Kontrol)	12.5tu	0.0u	47.5k-n	0.0u	0.0u	0.0u	0.0u	0.0u
2	67.5g-j	37.5l-q	82.5a-g	45.0k-o	67.5g-j	27.5o-t	80.0b-g	25.0p-t
3	97.5ab	45.0k-o	90.0a-e	37.5l-q	90.0a-e	27.5o-t	87.5a-f	37.5l-q
4	90.0a-e	52.5j-m	95.0a-c	42.5k-p	72.5e-i	37.5l-q	27.5o-t	35.0m-r
5	95.0abc	45.0k-o	92.5a-d	40.0k-q	85.0a-g	52.5j-m	77.5c-g	32.5n-s
6	85.0a-g	37.5l-q	100.0a	25.0p-t	70.0f-j	15.0s-u	40.0k-q	37.5l-q
7	85.0a-g	40.0k-q	100.0a	35.0m-r	70.0f-j	22.5q-t	57.5h-k	37.5l-q
8	97.5ab	55.0i-l	70.0f-j	40.0k-q	87.5a-f	27.5o-t	80.0b-g	75.0d-h
9	95.0a-c	40.0k-q	90.0a-e	40.0k-q	82.5a-g	12.5tu	80.0b-g	75.0d-h
LSD (0.05)		17.69						
F değeri		3.091						
SE (+/-)		0.280						
Pr>F		<0.001						
Önemlilik (P)		***						
Genel ortalma		53.78						

* LSD testi ile ayrılan ortalamaları karşılaştırmak için üç yönlü ANOVA kullanılmıştır. Bir sütun içinde farklı harfle ifade edilen ortalamalar $p \leq 0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

Eksplant x genotip x indüksiyon ortamı arasındaki üçlü interaksyonun kallus oluşumu üzerine etkileri Çizelge 4.29 da ortaya konulmuştur. Eksplant, genotip ve ortam arasındaki üç yönlü interaksyonun kallus oluşumu için LSD değeri 17.69 olup, en yüksek kallus üretimi Sarıçanak genotipinin 6. ve 7. ortamlarında kültüre alınan skutellum eksplantlarında, en düşük kallus üretimi ise Svevo genotipinin 6. ve 9. ortamlarında kültüre alınan yaprak eksplantları ile Ceyhan-99 genotipinin kontrol ortamındaki skutellum eksplantlarında gerçekleşmiştir (Çizelge 4.29).

Çizelge 4.30. III. Grup somatik embriyogenesis denemelerinde eksplant x genotip x indüksiyon ortamı interaksyonunun embriyojenik kallus oluşumu üzerine etkileri*

İndüksiyon Ortamı	İndüksiyon Ortamlarında Embriyojenik Kallusların Oluştığı Genotipler ve Eksplantları							
	Ceyhan-99		Sarıçanak		Svevo		Sagittario	
	Skutellum	Yaprak	Skutellum	Yaprak	Skutellum	Yaprak	Skutellum	Yaprak
1 (Kontrol)	0.00t	0.00t	0.00t	0.00t	0.00t	0.00t	0.00t	0.00t
2	27.5k-r	30.0k-q	50.0d-j	45.0e-k	22.5m-s	27.5k-r	65.0a-d	32.5j-p
3	45.0e-k	20.0n-s	17.5o-t	32.5j-p	45.0e-k	17.5o-t	62.5a-e	32.5j-p
4	20.0n-s	35.0i-o	10.0r-t	35.0i-o	0.0t	22.5m-s	72.5ab	22.5m-s
5	80.0a	42.5f-l	35.0i-o	40.0g-m	80.0a	45.0e-k	20.0n-s	30.0k-q
6	70.0a-c	37.5h-n	55.0b-h	22.5m-s	57.5b-g	15.0p-t	17.5o-t	37.5h-n
7	35.0i-o	35.0i-o	22.5m-s	35.0i-o	20.0n-s	17.5o-t	35.0i-o	32.5j-p
8	15.0p-t	52.5c-i	17.5o-t	5.0st	17.5o-t	25.0l-r	60.0b-f	55.0b-h
9	5.0st	40.0g-m	30.0k-q	37.5h-n	10.0r-t	12.5q-t	30.0k-q	57.5b-g
LSD (0.05)		18.31						
F değeri		5.807üç						
SE (+/-)		0.290						
Pr>F		<0.00						
Önemlilik (P)		**						
Genel ortalma		30.24						

* LSD testi ile ayrılan ortalamaları karşılaştırmak için üç yönlü ANOVA kullanılmıştır. Bir sütun içinde farklı harfle ifade edilen ortalamalar $p \leq 0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

Eksplant x genotip x indüksiyon ortamı arasındaki üçlü interaksyonun embriyojenik kallus oluşumu üzerine etkileri Çizelge 4.30 da gösterilmiştir. Üç yönlü interaksyon açısından yapılan analizlerde F değeri 5.807, P değeri 0.001'dan küçük ve LSD değeri 18.31 olarak bulunmuştur. En yüksek embriyojenik kallus üretimi 5. ortamda kültüre alınan Sagittario genotipi (ortalama = 80.0) ve Svevo genotipinin (ortalama =

80.0) skutellum eksplantlarında oluşmuştur. En düşük embriyojenik kallus üretimi (ortalama = 5) ise 8. ortamda kültüre alınan Sarıçanak genotipinin yaprak eksplantında meydana gelmiştir (Çizelge 4.30).

Çizelge 4.31. III. Grup somatik embriyogenesis denemelerinde eksplant x genotip x indüksiyon ortamı interaksiyonunun kallus boyutu üzerine etkileri*

İndüksiyon Ortamı	İndüksiyon Ortamlarında Kallus Boyutlarının Oluştugu Genotipler ve Eksplantları							
	Ceyhan-99		Sarıçanak		Svevo		Sagittario	
	Skutellum	Yaprak	Skutellum	Yaprak	Skutellum	Yaprak	Skutellum	Yaprak
1 (Kontrol)	0.24yz	0.00z	2.28p-v	0.00z	0.00z	0.00z	0.00z	0.00z
2	3.31g-p	3.36e-p	2.86l-r	3.72c-n	2.47o-t	1.76r-x	3.77c-n	2.36p-v
3	4.72a-d	4.04b-l	3.89c-m	1.22u-z	4.56a-f	3.13i-q	5.37a	2.55n-t
4	4.71a-d	4.10b-k	4.17a-j	2.86l-r	2.88k-r	2.24p-w	3.89c-m	1.48s-x
5	4.57a-e	3.33f-p	4.50a-g	2.79m-r	4.81a-d	3.27h-p	4.87a-c	2.02q-w
6	4.44a-h	2.75m-r	4.65a-d	1.41t-y	2.76m-r	0.66x-z	1.04w-z	2.74m-r
M7	4.41a-h	2.94j-r	3.15i-q	2.34p-v	2.22p-w	1.13v-z	2.39p-u	2.42o-u
M8	3.73c-n	3.63d-o	2.72m-s	2.74m-r	4.14a-j	1.21u-z	3.82c-m	4.92a-c
9	3.30g-p	2.43o-u	3.23h-q	2.56n-t	3.80c-m	0.59x-z	4.22a-i	5.13ab
LSD (0.05)		1.23						
F değeri		4.390						
SE (+/-)		0.019						
Pr>F		<0.001						
Önemlilik (P)		***						
Genel ortalma		2.86						

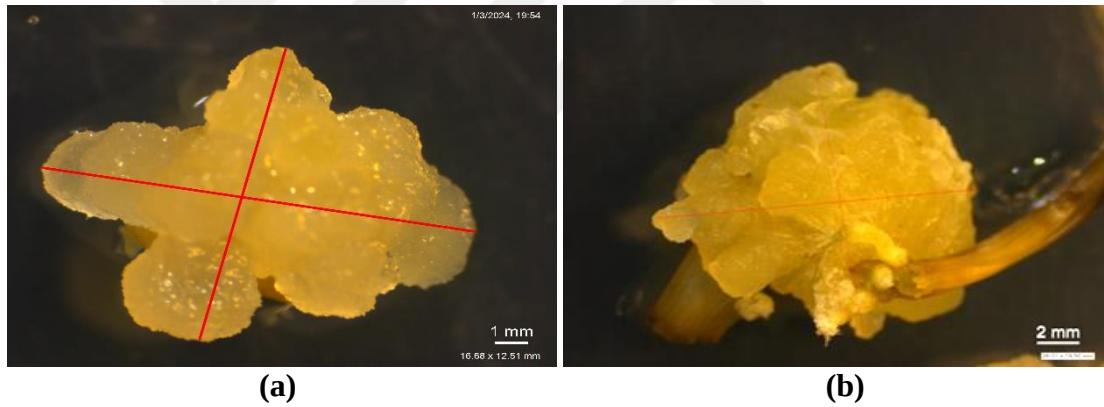
* LSD testi ile ayrılan ortalamaları karşılaştırmak için üç yönlü ANOVA kullanılmıştır. Bir sütun içinde farklı harfle ifade edilen ortalamalar $p \leq 0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

Eksplant x genotip x indüksiyon ortamı arasındaki üçlü interaksiyonun kallus boyutu üzerine etkileri Çizelge 4.31 de gösterilmiştir. Kallus boyutu yönünden eksplant faktörü 101.592 F-değerine ve 0.001 den küçük P-değerine sahiptir. Genotipin F-değeri 20.148 ve P-değeri <0.001 iken, indüksiyon ortamının F-değeri 43.857 ve P-değeri 0.001 den küçük bir değer bulunmuştur. Üç yönlü etkileşim (eksplant x genotip x ortam) ise 4.390 F-değerine ve <0.001 P-değerine sahiptir.

Kallus boyutu yönünden; eksplant tipinin LSD değeri 0.20 olup, skutellum (ortalama = 3.39), yaprak eksplantına (ortalama = 2.33) kıyasla daha yüksek kallus boyutu oluşturmuştur (Şekil 4.12). Genotiplerin LSD değeri 0.29 olup, Ceyhan-99 en

yüksek (ortalama = 3.33) ve Svevo en düşük (ortalama = 2.21) kallus büyüklüğünü meydana getirmiştir. İndüksiyon ortamının LSD değeri 0.43 olup, 5. ortam en yüksek kallus boyutunu (ortalama = 3.77) ve 1. ortamda en düşük kallus boyutunu (ortalama = 0,31) oluşturmuştur (Çizelge 4.28). Kallus boyutu yönünden; üçlü interaksyonun LSD değeri ise 1.23 olup, en yüksek kallus büyüklüğü 3. ortamda kültüre alınan Sagittario genotipinin skutellum eksplantlarında (ortalama = 5.37) ve en düşük kallus büyüklüğü ise kontrol ortamında kültüre alınan Ceyhan-99 genotipinin skutellum eksplantlarında meydana gelmiştir (Çizelge 4.31).

Bu bulgular, tüm faktörlerin (eksplant tipi, genotip ve indüksiyon ortamı) ve bunların interaksyonlarının toplam kallus oluşumu, embriyogenik kallus üretimi ve kallus boyutunu önemli ölçüde etkilediğini göstermiştir. Dolayısıyla sonuçlar, buğday somatik embriyogenesiste kallus ve embriyogenik kallus üretiminin yanı sıra kallus boyutunu artırmak için bu faktörlerin optimize edilmesinin önemini vurgulamıştır (Çizelge 4.31).



Şekil 4.11. III. Grup somatik embriyogenesis denemelerinde; (a) skutellum eksplantından oluşan kallus boyutu, (b) yaprak eksplantından oluşan kallus boyutu.

Eksplant x genotip x indüksiyon ortamı arasındaki üçlü interaksyonun kallus ağırlığı üzerine etkileri Çizelge 4.32 de verilmiştir. Kallus ağırlığı yönünden eksplant tipi 142.42 F-değerine ve 0.001'den küçük bir P-değerine sahiptir. Genotipin F-değeri 16.124 ve P-değeri <0.001 iken, ortamın F-değeri 10,754 ve P-değeri 0.001'den küçük bulunmuştur. Üç yönlü etkileşim (eksplant x genotip x ortam) ise 1.650 F-değerine ve <0.05 P-değerine sahiptir. Kallus ağırlığı yönünden LSD post hoc test sonuçlarına göre eksplant tipi nin LSD değeri 7.76 olup, yaprak eksplantı (ortalama = 70.86) skutellum eksplantından (ortalama = 23.68) daha ağır kallus oluşturmuştur. Genotipler için LSD

değeri 10.97 olup, Sagittario genotipi en ağır kallus (ortalama = 70.13 mg) ve Svevo en hafif kallus (ortalama = 34.52 mg) ağırlığını vermiştir. Ortam için LSD değeri 16.46 olup, 6.ortam en ağır kallus (ortalama = 71.15 mg) ve 1.ortam (kontrol) en hafif kallusları (ortalama = 2.05 mg) oluşturmuştur (Çizelge 4.28). Üç yönlü etkileşimin LSD değeri ise 46.57 olup, en ağır kallus 6.ortamda kültüre alınan Sagittario genotipinin yaprak eksplantlarında (ortalama = 229.71mg) ve en hafif kallus ise kontrol ortamında kültüre alınan Ceyhan-99 genotipinin skutellum eksplantlarında oluşmuştur (Çizelge 4.32).

Çizelge 4.32. III. Grup somatik embriyogenesis denemelerinde eksplant x genotip x indüksiyon ortamı interaksiyonunun kallus ağırlığı üzerine etkileri*

İndüksiyon Ortamı	İndüksiyon Ortamlarında Kallus Ağırlıklarının Oluştugu Genotipler ve Eksplantları							
	Ceyhan-99		Sarıçanak		Svevo		Sagittario	
	Skutellum	Yaprak	Skutellum	Yaprak	Skutellum	Yaprak	Skutellum	Yaprak
1 (Kontrol)	4.98uv	0.00v	11.44t-v	0.00v	0.00v	0.00v	0.00v	0.00v
2	34.12l-v	85.18e-j	27.95l-v	63.09g-r	18.10q-v	63.75g-q	22.50o-v	151.75bc
3	25.56m-v	74.03f-l	26.54m-v	38.71j-v	18.21q-v	33.09l-v	23.18n-v	133.16cd
4	22.98n-v	61.60g-r	22.33o-v	40.51i-v	24.12n-v	23.90n-v	12.39s-v	127.76c-e
5	49.78g-u	83.60e-k	24.68n-v	46.85h-u	33.81l-v	44.62h-v	24.60n-v	86.41e-i
6	23.91n-v	59.12g-r	37.36k-v	56.55g-t	22.41o-v	95.71d-g	44.45h-v	229.71a
7	10.81t-v	90.34d-h	36.47l-v	72.00f-m	20.91p-v	53.08g-t	26.43m-v	188.94ab
8	16.99r-v	56.56g-t	35.46l-v	67.80g-o	19.59p-v	65.93g-p	25.64m-v	116.31c-f
9	31.56l-v	85.06e-j	26.31m-v	69.36g-mn	25.61m-v	58.59g-s	21.31o-v	27.90l-v
LSD (0.05)		46.57						
F değeri		1.650						
SE (+/-)		0.368						
Pr>F		<0.05						
Önemlilik (P)		*						
Genel ortalma		47.27						

* LSD testi ile ayrılan ortalamaları karşılaştırmak için üç yönlü ANOVA kullanılmıştır. Bir sütun içinde farklı harfle ifade edilen ortalamalar p≤0.05 düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

4.2.3.2. Genotip, eksplant ve indüksiyon ortamı faktörlerinin yeşil nokta oluşumu, rejenerant bitki oranı ve kallus başına sürgün sayısı üzerine etkileri

III. grup somatik embriyogenesis denemelerinde öncelikle 4 buğday genotipinin skutellum ve yaprak eksplantlarının her birisi temel besin ortamı Modifiye edilmiş CHB ortamı [CHB-3 ortamı (Chu vd. 1990)] olan ve 30 gr/L sukroz karbonhidrat kaynağı eklenmiş 9 farklı indüksiyon ortamında kültüre alınmıştır. Bu indüksiyon ortamlarında

oluşan embriyojenik kalluslar rejenere olabilmeleri için 2 farklı rejenerasyon ortamına (Çizelge 3.12) aktarılmış, daha sonra bunlardan oluşan yeşil nokta sayısı, kallus başına sürgün sayısı ve rejenerant bitki sayısı verileri kaydedilmiştir. Bu rejenerasyon denemelerinde eksplant tipi, genotip ve rejenerasyon ortamı faktörlerinin yeşil nokta sayısı, kallus başına sürgün sayısı ve rejenerant bitki sayısı üzerindeki etkilerini belirlemek için üç yönlü varyans analizi yapılmıştır (Çizelge 4.33).

Çizelge 4.33' e göre eksplant tipi ($F = 0.509$, $p = 0.47$) ve genotip ($F = 2.721$, $p = 0.10$) faktörleri yeşil nokta oluşumu üzerine önemli bir fark oluşturmamıştır. Ancak, rejenerasyon ortamları arasında önemli fark gözlenmiştir ($F = 4.545$, $P < 0.05$). Bu faktörler arasında, eksplant tipi ($F = 4.107$, $P < 0.05$) rejenerant bitki üretimini önemli ölçüde etkilemiştir. Buna karşılık, hiçbir faktör kallus başına sürgün sayısını veya rejenerant bitki üretimini önemli ölçüde etkilememiştir. Ayrıca, eksplant x genotip x rejenerasyon ortamı arasındaki etkileşim incelendiğinde de, yeşil nokta ($F = 2.547$, $p = 0.11$), kallus başına sürgün ($F = 1.605$, $P = 0.20$) ve rejenerant bitki ($F = 1.422$, $P = 0.23$) için önemli bir fark bulunmamıştır (Çizelge 4.34). Skutellum eksplantlarında yeşil nokta üretimi ortalama 16.54 iken, yaprak segmentlerinde ortalama 14.38'dir. Genotipler arasında en yüksek yeşil nokta üretimi 20.02 ortalama ile Ceyhan-99'da, en düşük yeşil nokta üretimi ise 11.19 ortalama ile Sagittario'da gözlenmiştir. ModCHB-R1 ve ModCHB-R2 rejenerasyon ortamlarından (Çizelge 3.12) yeşil nokta üretimi ortalama değerleri sırasıyla 18.68 ve 12.25'tir. Skutellum eksplantlarında ortalama 0.86 ve yaprak parçalarında 0.33 rejenerant bitki üretilmiştir.

Genotipler arasında, Ceyhan-99 ortalama 1.00 ile en yüksek sayıda rejenerant bitki üretirken, Sarıçanak ortalama 0.08 ile en düşük sayıda rejenerant bitki üretmiştir. ModCHB-R1 ve ModCHB-R2 rejenerasyon ortamlarının kallus başına oluşturduğu sürgün ortalamaları sırasıyla 3.93 ve 2.77 olmuştur.

Çizelge 4.33. III.grup somatik embriyogenesis denemelerinde genotip, eksplant ve rejenerasyon ortamının yeşil nokta sayısı, kallus başına sürgün sayısı ve rejenerant bitki sayısı üzerine etkileri*

Faktörler	Kültüre Alınan Kallus Sayısı (Adet)	Yeşil Nokta Sayısı (Adet)	Kallus Başına Sürgün Sayısı (Adet)	Rejenerant Bitki Sayısı (Adet)
Eksplant Tipi				
Skutellum	1077	16.54a	4.44a	0.86a
Yaprak	488	14.38a	2.26a	0.33b
LSD(0.05)		5.96	3.24	0.51
F value		0.509	1.763	4.107
Pr (>F)		0.4766	0.18	0.04
SE (+/-)		0.754	0.410	0.065
Genotip				
Ceyhan-99	429	20.02a	5.41a	1.00a
Sarıçanak	429	13.19ab	0.38b	0.08b
Svevo	335	17.44ab	2.41ab	0.38ab
Sagittario	372	11.19b	5.19a	0.91a
LSD(0.05)		8.42	4.59	0.72
F value		2.721	0.034	0.002
Pr (>F)		0.1014	0.83	0.96
SE (+/-)		0.533	0.290	0.046
Rejenerasyon Ortamı				
R1	779	18.68a	3.93a	0.86a
R2	786	12.25b	2.77a	0.33b
LSD(0.05)		5.94	3.24	0.51
F value		4.54	0.493	0.921
Pr (>F)		0.03	0.43	0.331
SE (+/-)		0.754	0.410	0.065
Önemlilik (P)				
Eksplant		ÖD	ÖD	*
Genotip		ÖD	ÖD	ÖD
Rejenerasyon Ortamları		*	ÖD	ÖD
Genel ortalama		15.46	3.35	0.59

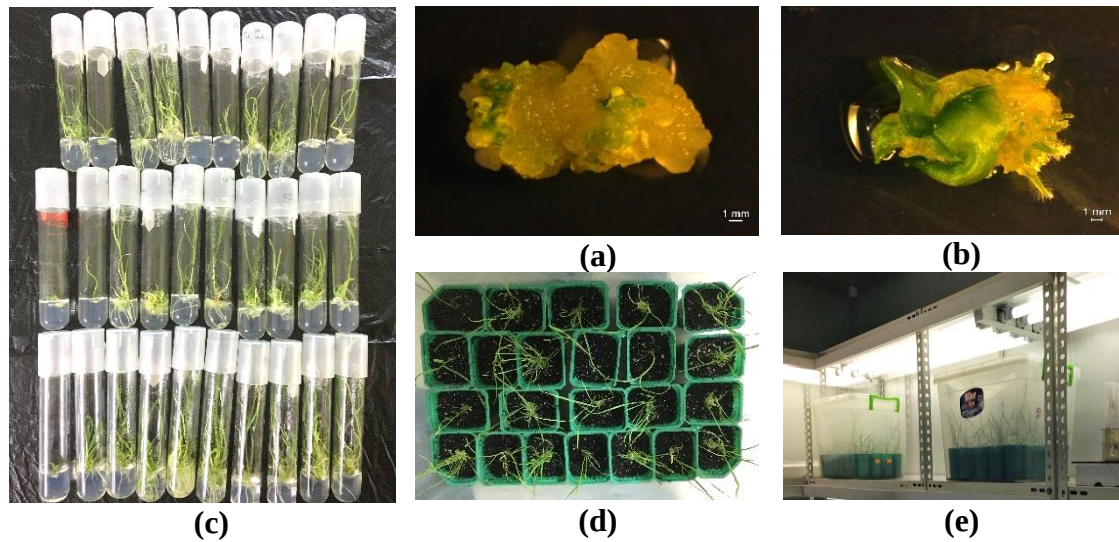
* LSD testi ile ayrılan ortalamaları karşılaştırmak için iki yönlü ANOVA kullanılmıştır. Bir sütun içinde farklı harfle ifade edilen ortalamalar $p \leq 0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

Skutellum eksplantlarında kallus başına düşen sürgün sayısı ortalama 4.44 iken, yaprak segmentlerinde ortalama 2.26'dır. Ceyhan-99 genotipi 5.41 ortalama ile en yüksek kallus başına sürgün sayısını üretirken, en düşük ortalama 0.38 ile Sarıçanak tarafından üretilmiştir. Rejenerant bitki oluşumu yönünden ise ModCHB-R1 ve ModCHB-R2 rejenerasyon ortamları sırasıyla 0.72 ve 0.47 ortalamalar vermiştir (Çizelge 4.33).

Eksplant x genotip x rejenerasyon ortamı arasındaki üçlü interaksiyonun yeşil nokta sayısı, kallus başına sürgün sayısı ve rejenerant bitki sayısı üzerine etkileri Çizelge 4.34 de verilmiştir.

Çizelge 4.34' e göre eksplant x genotip x rejenerasyon ortamı arasındaki etkileşim kaydedilen parametreler üzerine önemli bir etkide bulunmamıştır. Bununla birlikte, en yüksek yeşil nokta üretimi ModCHB-R1 rejenerasyon ortamında kültüre alınan Ceyhan-99 genotipinin yaprak eksplantlarından elde edilmiştir. En düşük yeşil nokta üretimi ise ModCHB-R2 ortamında kültüre alınan Sarıçanak genotipinin skutellum eksplantlarında gerçekleşmiştir. Kallus başına en yüksek sürgün sayısı (12.11) ModCHB-R1 ortamında kültüre alınan Ceyhan-99 genotipinin skutellum eksplantlarından üretilirken, kallus başına en düşük sürgün sayısı (0.22) ise ModCHB-R2 ortamında kültüre alınan Svevo genotipinin yaprak eksplantlarında gerçekleşmiştir. Son olarak, rejenere bitkilerle ilgili olarak en yüksek bitki sayısı (2.33 ortalama) ModCHB-R1 ortamında kültüre alınan Ceyhan-99 genotipinin skutellum eksplantlarından elde edilirken, en düşük oran (0.11) ModCHB-R2 ortamında kültüre alınan Svevo genotipinin yaprak eksplantlarında gerçekleşmiştir (Çizelge 4.34).

III. grup somatik embriyogenesis denemelerindeki yeşil nokta, sürgün ve bitki gelişimleri ile aklimatize edilmiş bazı bitkiciklerin görüntüleri Şekil 4.12 de verilmiştir.



Şekil 4.12. III. Grup somatik embriyogenesis denemelerinde; (a) gelişmiş yeşil noktalar, (b) yeşil noktalardan sürgün oluşumu, (c) rejenere bitkiciklerin gelişimi, (d,e) aklimatizasyonu yapılan bitkicikler

Çizelge 4.34. III.grup somatik embriyogenesis denemelerinde genotip x eksplant x rejenerasyon ortamı interaksiyonunun yeşil nokta, kallus başına sürgün ve rejenerant bitki üzerine etkileri*

Genotip	Eksplant	Yeşil Nokta Sayısı (Adet)		Kallus başına Sürgün Sayısı (Adet)		Rejenerant Bitki Sayısı (Adet)	
		Rejenerasyon Ortamları					
		R1	R2	R1	R2	R1	R2
Ceyhan-99	Skutellum	23.88abc	24.00ab	12.11a	5.88abc	2.33a	1.22abc
	Yaprak	24.88a	7.33bcd	3.66abc	0.00c	0.11bc	0.00c
Sarıçanak	Skutellum	11.66a-d	6.44d	0.66c	0.00c	0.11bc	0.00c
	Yaprak	19.88a-d	14.77a-d	0.88c	0.00c	0.22bc	0.00c
Svevo	Skutellum	23.22a-d	16.33a-d	4.77abc	4.66abc	0.88abc	0.55bc
	Yaprak	15.44a-d	14.77a-d	0.00c	0.22c	0.00c	0.11bc
Sagittario	Skutellum	19.66a-d	7.11cd	6.88abc	0.55c	1.44abc	0.33bc
	Yaprak	10.77a-d	7.22bcd	2.44bc	10.88ab	0.33bc	1.55ab
LSD(0.05)		16.87		9.18		1.45	
F value		2.547		1.605		1.422	
Pr>F		0.11		0.20		0.23	
SEm(+/-)		0.266		0.145		0.023	
Önemlilik (P)		ÖD		ÖD		ÖD	
Genel Ortalama		15.46		3.35		0.59	

* LSD testi ile ayrılan ortalamaları karşılaştırmak için üç yönlü ANOVA kullanılmıştır. Bir sütun içinde farklı harfle ifade edilen ortalamalar $p \leq 0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

4.2.4. IV. Grup somatik embriyogenesis deneme bulguları

4.2.4.1. Genotip, eksplant ve indüksiyon ortamı faktörlerinin toplam kallus oluşumu, embriyojenik kallus oranı, kallus boyutu ve kallus ağırlığı üzerine etkileri

IV. grup somatik embriyogenesis denemelerinde; 4 buğday genotipinin skutellum ve yaprak eksplantlarının her birisi temel besin ortamı Modifiye edilmiş CHB ortamı [CHB-3 ortamı (Chu vd. 1990)] olan ve 30 gr/L maltoz karbonhidrat kaynağı eklenmiş 9 farklı indüksiyon ortamında kültüre alınmıştır. Bu denemelerde eksplant tipi, genotip ve ortamın kallus oluşumu, embriyojenik kallus oranı, kallus boyutu ve kallus ağırlığı üzerindeki etkilerini belirlemek için üç yönlü varyans analizi yapılmıştır (Çizelge 4.35).

Çizelge 4.35. IV. Grup somatik embriyogenesis denemelerinde genotip, eksplant ve indüksiyon ortamının toplam kallus oluşumu, embriyojenik kallus oranı, kallus boyutu ve kallus ağırlığı üzerindeki etkileri*

Faktörler	Kallus Oluşumu (%)	Embriyojenik Kallus Oluşumu (%)	Kallus Boyutu (mm)	Kallus Ağırlığı (mg)
Eksplant				
Skutellum	68,40a	47.43a	2.46a	27.59b
Yaprak	31,52b	15.34b	1.98b	107.07a
LSD (0.05)	3,00	2.68	0.17	11.94
F değeri	579.341	548.518	28.149	162.
SE (+/-)	1.712	1.531	0.100	3.400
P r>F	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Genotip				
Ceyhan-99	60.83a	40.13a	2.91a	86.14a
Sarıçanak	54.58b	35.69b	2.37b	78.11ab
Svevo	35.27c	18.88d	1.48c	64.13b
Sagittario	49.16c	30.83c	2.12b	44.90c
LSD (0.05)	4,24	3.79	0.24	16.89
F değeri	50.531	44.702	44.042	8.823
SE (+/-)	1.211	1.082	0.070	2.404
P r>F	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
İndüksiyon ortamı				
1(kontrol)	7.5d	0.00e	0.31d	2.05c
2	49.68c	19.68d	2.52ab	92.32a
3	50.93bc	38.12b	2.56ab	86.62a
4	56.25ab	20.00d	2.56ab	73.90ab
5	59.68a	52.81a	2.80a	77.12ab
6	50.62bc	24.06cd	1.97c	54.66b
7	58.75a	49.68a	2.56ab	72.00ab
8	55.62a-c	29.68c	2.22bc	70.19ab
9	60.62a	48.43a	2.48ab	86.01a
LSD (0.05)	6.37	5.69	0.37	25.33
F değeri	51.165	72.185	31.499	8.903
SE (+/-)	0.807	0.721	0.047	1.602
P r>F	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Önemlilik (P)				
Eksplant	***	***	***	***
Genotip	***	***	***	***
İnd. Ortamı	***	***	***	***
Genel ortalama	49.96	31.38	2.22	68.32

* LSD testi ile ayrılan ortalamaları karşılaştırmak için üç yönlü ANOVA kullanılmıştır. Bir sütun içinde farklı harfle ifade edilen ortalamalar $p \leq 0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

Çizelge 4.35' e göre; eksplant tipi ($F=579.341$, $P<0.001$), genotip ($F=50.531$, $P<0.001$) ve indüksiyon ortamı ($F=51.165$, $P <0.001$) faktörleri kallus oluşumu üzerine önemli etkilerde bulunmuştur. Farklı eksplantların toplam kallus üretimi üzerindeki etkisinin analizi önemli farklılıklar ortaya koymuştur. Skutellum eksplantı, yaprak

eksplantına kıyasla önemli ölçüde daha yüksek kallus üretimi göstermiştir. Özellikle, skutellum eksplantı için ortalama kallus üretimi 68.4 iken, yaprak eksplantı için ortalama kallus üretimi 31.53 olmuştur. Ayrıca, dört genotip arasında kallus üretiminde de önemli farklılıklar gözlenmiştir. Ceyhan-99 genotipinde en yüksek (ortalama 60.83) kallus üretimini gerçekleştirirken, en düşük (ortalama 38.52) kallus üretimi Sagittario genotipinde kaydedilmiştir. Aynı şekilde, kullanılan indüksiyon ortamının içeriği de kallus üretimi üzerinde önemli etkide bulunmuştur. Test edilen 9 indüksiyon ortamı arasında, en yüksek ortalama kallus üretimini sağlayan 4. ortam (ortalama 82.13) olmuş, bunu 5.ortam (ortalama 75,48) ve 6.ortam (68,17) izlemiştir. Buna karşılık, 9.ortam en düşük kallus üretimine (ortalama 20.37) olmuştur. Bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı olup, optimum kallus üretimi için uygun indüksiyon ortamının seçilmesinin önemini göstermektedir (Çizelge.4.35). Eksplant tipi, genotip ve ortam arasında da önemli üçlü interaksiyon etki bulunmuştur ($F=3.685$, $P < 0.001$) (Çizelgede 4.36.)

Çizelge 4.36. IV. Grup somatik embriyogenesis denemelerinde eksplant x genotip x indüksiyon ortamı interaksiyonunun toplam kallus oluşumu üzerine etkileri*

İndüksiyon Ortamı	İndüksiyon Ortamlarında Kallus Oluşumunun Gerçekleştiği Genotipler ve Eksplantları							
	Ceyhan-99		Sarıçanak		Svevo		Sagittario	
	Skutellum	Yaprak	Skutellum	Yaprak	Skutellum	Yaprak	Skutellum	Yaprak
1 (Kontrol)	12.5uv	0.0v	47.5l-q	0.0v	0.0v	0.0v	0.0v	0.0v
2	97.5ab	40.0n-s	72.5e-j	35.0p-t	25.0r-u	30.0q-u	65.0g-l	32.5p-t
3	95.0a-c	42.5m-r	67.5g-k	35.0p-t	35.0p-t	32.5p-t	70.0f-j	30.0q-u
4	87.5a-f	50.0k-p	97.5ab	32.5p-t	37.5o-t	42.5m-r	70.0f-j	32.5p-t
5	92.5a-d	55.0j-o	90.0a-e	37.5o-t	62.5g-l	30.0q-u	77.5c-h	32.5p-t
6	97.5ab	35.0p-t	55.0j-o	27.5r-u	40.0n-s	30.0q-u	80.0b-g	40.0n-s
7	100.0a	32.5p-t	95.0a-c	20.0tu	77.5c-h	22.5s-u	92.5a-d	30.0q-u
8	100.0a	30.0q-u	95.0a-c	37.5o-t	55.0j-o	30.0q-u	57.5i-n	40.0n-s
9	100.0a	27.5r-u	97.5ab	40.0n-s	57.5i-n	27.5r-u	60.0h-m	75.0d-i
LSD (0.05)		18.02						
F değeri		3.685						
SE (+/-)		0.285						
Pr>F		<0.000						
Önemlilik (P)		***						
Genel ortalma		49.96						

* LSD testi ile ayrılan ortalamaları karşılaştırmak için üç yönlü ANOVA kullanılmıştır. Bir sütun içinde farklı harfle ifade edilen ortalamalar $p \leq 0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

Eksplant x genotip x indüksiyon ortamı arasındaki üçlü interaksiyon kallus üretimi üzerinde önemli etkide bulunmuş olup, faktörlerin etkileri Çizelge 4.36 da ortaya konulmuştur. En yüksek kallus üretimi 7. ortamda kültüre alınan Ceyhan-99 genotipinin

skutellum eksplantlarında gerçekleşmiştir. En düşük kallus ise aynı genotip ve eksplant tipi 1. ortamda kültüre alındığında oluşmuştur (Çizelge 4.36).

Embriyojenik kallus üretimi yönünden skutellum eksplantı, yaprak eksplantına göre önemli ölçüde daha fazla göstermiştir. Spesifik olarak, skutellum eksplantı ile ortalama embriyojenik kallus üretimi %47.43 iken, yaprak eksplantı ile ortalama embriyojenik kallus üretimi %15.34 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.35). Ayrıca, dört genotip arasında embriyojenik kallus üretiminde de önemli farklılıklar gözlenmiştir. Ceyhan-99 genotip ortalama %60.83 ile en yüksek embriyojenik kallus üretimini gerçekleştirirken, en düşük embriyojenik kallus üretim ortalaması Sagittario genotipi %38.52 için kaydedilmiştir (Çizelge 4.35). Kullanılan indüksiyon ortamının içeriği de kallus üretimi üzerinde önemli etkiye sahip bulunmuştur. Embriyojenik kallus tüm ortamlarda oluşmuş ve kontrol ortamından önemli ölçüde farklılık göstermiştir. Test edilen 9 indüksiyon ortamı arasında, en yüksek ortalama embriyojenik kallus üretimini sağlayan ortam 5.ortam %52.81 iken, 2. ortam embriyojenik kallus üretimi en düşük ortalamayı %13.68 vermiştir. Bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı olup, optimum embriyojenik kallus üretimi için uygun indüksiyon ortamının seçilmesinin önemini göstermektedir (Çizelge 4.35). Eksplant x genotip x indüksiyon ortamı arasındaki üçlü interaksiyonun embriyojenik kallus oluşumu üzerine etkileri Çizelge 4.37 de verilmiştir.

Çizelge 4.37 ye göre, en fazla embriyojenik kallus 7. ortamda kültüre alınan Ceyhan-99 genotipinin skutellum eksplantlarında, en düşük ise 4. ortamda kültüre alınan Svevo genotipinin yaprak eksplantlarında kaydedilmiştir. Bu sonuç, bu özel kombinasyonun embriyojenik kallus oluşumuna faydalı olabileceğine işaret etmektedir. Bunun nedeni, bu genotipteki skutellum dokusundaki doğal totipotensi özelliğinin yanı sıra 7. ortamın embriyogenesi destekleyebilecek spesifik bileşenleri olabilir. Buna karşılık, Svevo genotipinden alınan yaprak eksplantlarında 4. ortamdaki düşük embriyojenik kallus üretimi, bu kombinasyonun kallus indüksiyonu için yeterince teşvik edici olmadığını göstermektedir. Bu durum, bu genotipteki yaprak dokusunun daha düşük rejenerasyon kapasitesine ve muhtemelen embriyogenesi desteklemek için 4.ortamdaki yetersiz besin veya hormonal koşullara bağlanabilir (Çizelge 4.37)

Çizelge 4.37. IV. Grup somatik embriyogenesis denemelerinde eksplant x genotip x indüksiyon ortamı interaksiyonunun embriyogenik kallus oluşumu üzerine etkileri*

İndüksiyon Ortamı	İndüksiyon Ortamlarında Embriyogenik Kallusların Oluştığı Genotipler ve Eksplantları							
	Ceyhan-99		Sarıçanak		Svevo		Sagittario	
	Skutellum	Yaprak	Skutellum	Yaprak	Skutellum	Yaprak	Skutellum	Yaprak
1 (Kontrol)	0.0x	0.0x	0.0x	0.0x	0.0x	0.0x	0.0x	0.0x
2	12.5t-x	5.0wx	52.5i-l	17.5r-w	5.0wx	0.0x	65.0f-j	0.0x
3	80.0c-f	35.0m-q	67.5e-i	15.0s-x	22.5 q-v	0.0x	55.0h-l	30.0n-s
4	32.5n-r	15.0s-x	40.0l-p	12.5t-x	12.5t-x	5.0wx	42.5k-o	0.0x
5	92.5a-c	52.5i-l	90.0a-c	17.5r-w	55.0h-l	15.0s-x	72.5d-g	27.5o-t
6	40.0l-p	35.0m-q	35.0m-q	22.5q-v	17.5r-w	17.5r-w	25.0p-u	0.0x
7	100.0a	30.0n-s	82.5b-e	10.0u-x	70.0e-h	7.5v-x	87.5a-d	10.0u-x
8	45.0k-n	30.0n-s	55.0h-l	27.5o-t	17.5r-w	30.0n-s	32.5n-r	0.0x
9	90.0a-c	27.5o-t	97.5ab	0.0x	57.5g-k	7.5v-x	57.5g-k	50.0j-m
LSD (0.05)		16.11						
F değeri		4.512						
SE (+/-)		0.255						
Pr>F		<0.001						
Önemlilik (P)		***						
Genel ortalma		31.38						

* LSD testi ile ayrılan ortalamaları karşılaştırmak için üç yönlü ANOVA kullanılmıştır. Bir sütun içinde farklı harfle ifade edilen ortalamalar $p \leq 0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

Eksplant x genotip x indüksiyon ortamı interaksiyonunun kallus boyutu üzerine etkileri Çizelge 4.38 de verilmiştir. Çizelge 4.38'e göre kallus boyutu üzerinde güçlü etkilere işaret eden tüm faktörler ve bunların interaksiyonları oldukça önemli etkiye sahiptir. Eksplant tipi için F değeri 28.14 ve P değeri <0.001, genotip için F değeri 44,04 ve P değeri <0.001, indüksiyon ortamı içinse F değeri 31.49 ve P değeri <0.001 dir. Eksplant x genotip x ortam interaksiyonunun F değeri 5.786 iken, P değeri ise <0.001 bulunmuştur. Bu sonuçlar, tüm bireysel faktörlerin yanı sıra bunların interaksiyonun da kallus boyutunu önemli ölçüde etkilediğini göstermektedir.

En büyük kallus boyutları ortalama 2.46 mm ile skutellum eksplantlarından kaydedilmiş, en küçük kallus boyutları ise ortalama 1.98 mm ile yaprak eksplantlarından kaydedilmiştir. Genotip açısından, en büyük kallus boyutları ortalama 2.91 mm ile Ceyhan-99 genotipinde kaydedilirken, en küçük kallus boyutları ortalama 1.48 mm ile Seveo genotipinde kaydedilmiştir. İndüksiyon ortamı ile ilgili olarak, en büyük kallus

boyutları ortalama 2.80 mm ile ortam 5'te kaydedilirken, en küçük kallus boyutları ortalama 0.31 mm ile kontrol ortamında kaydedilmiştir (Çizelge 4.35).

Üç yönlü interaksyonda ise en fazla kallus büyüklüğü 4.72 mm ortalama ile 9. ortamda kültüre alınan Segitario genotipinin yaprak eksplantlarından, en az kallus büyüklüğü ise 0.24 mm ortalama ile kontrol ortamında kültüre alınan Ceyhan-99 genotipinin skutellum eksplantlarından kaydedilmiştir (Çizelge 4.38).

Çizelge 4.38. IV. grup somatik embriyogenesis denemelerinde eksplant x genotip x indüksiyon ortamı interaksyonunun kallus boyutu üzerine etkileri*

İndüksiyon Ortamı	İndüksiyon Ortamlarında Kallus Boyutlarının Oluştığı Genotipler ve Eksplantları							
	Ceyhan-99		Sarıçanak		Svevo		Sagittario	
	Skutellum	Yaprak	Skutellum	Yaprak	Skutellum	Yaprak	Skutellum	Yaprak
1 (Kontrol)	0.24zA	0.0A	2.26m-u	0.0A	0.0A	0.0A	0.0A	0.0A
2	4.28a-c	4.03a-f	2.41j-s	2.14n-v	0.69y-A	2.29l-t	2.76h-r	1.55s-y
3	3.96a-g	4.16a-e	2.21m-u	2.20m-u	0.89x-A	2.30k-t	3.22d-m	1.55s-y
4	2.98g-o	3.76a-h	3.58b-h	1.57s-y	1.11v-z	2.93g-p	2.76h-r	1.81q-x
5	3.32c-l	4.52ab	3.66b-h	1.79r-x	2.36k-s	2.02o-w	2.86h-q	1.90p-x
6	3.50b-i	2.00o-w	1.78r-x	1.72r-y	1.02w-A	1.42s-y	2.76h-r	1.59s-y
7	4.24a-d	1.52s-y	3.96a-g	1.13v-z	3.12e-n	1.21u-z	3.43c-j	1.86q-x
8	3.33c-l	1.54s-y	3.35c-k	2.40j-s	1.137v-z	1.75r-x	1.76r-x	2.47i-s
9	3.77a-h	1.23u-z	3.51b-i	3.04f-o	1.05w-z	1.29t-z	1.26t-z	4.72a
LSD (0.05)		1.05						
F değeri		5.786						
SE (+/-)		0.016						
Pr>F		<0.001						
Önemlilik (P)		***						
Genel ortalma		2.22						

* LSD testi ile ayrılan ortalamaları karşılaştırmak için üç yönlü ANOVA kullanılmıştır. Bir sütun içinde farklı harfle ifade edilen ortalamalar $p \leq 0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

Eksplant x genotip x indüksiyon ortamı arasındaki üçlü interaksyonun kallus ağırlığı üzerine etkileri Çizelge 4.39. da verilmiştir. Çizelge 4.39 eksplant tipi, genotip, indüksiyon ortamı ve bunların etkileşimlerinin kallus ağırlığı üzerinde etkilerini göstermektedir. Eksplant tipi için F değeri 283.689 ve P değeri <0.001 olup, bu sonuç eksplant tipine bağlı olarak kallus ağırlığının değiştiğini göstermektedir. Genotip için F değeri 10.571 ve P değeri <0.001 olup, bu da farklı genotipler arasında kallus ağırlığında

önemli değişkenlik olduğunu göstermektedir. İndüksiyon ortamı için F değeri 19.007 ve P değeri <0.001 olup, ortamın kallus ağırlığı üzerindeki kritik etkisinin altı çizilmektedir. Eksplant x genotip x ortam interaksyonunu ise 3.671 F değerine ve $P = 0.10$ değerine sahiptir ve kallus ağırlığının belirlenmesinde bu faktörler arasındaki karmaşık interaksyon önemli bir farklılığa neden olmamıştır. En fazla kallus ağırlıkları ortalama 100.04 mg ile yaprak eksplantlarında kaydedilirken, en az kallus ağırlıkları ortalama 29,59 mg ile skutellum eksplantlarında tespit edilmiştir. Bu durum, yaprak eksplantlarının genellikle skutellum eksplantlarına kıyasla daha ağır kaluslar ürettiğini göstermektedir. Genotiplerin kallus ağırlığı üzerindeki etkisi değerlendirildiğinde, en ağır kallus ortalama 86.14 mg ile Ceyhan-99 genotipinde kaydedilmiştir. Buna karşılık, Sagitario genotipi ortalama 44.90 mg ile en hafif kallusları üretmiştir. Bu değişkenlik, genotipin kallus ağırlığını etkilemede önemli bir rol oynadığını göstermektedir. İndüksiyon ortamının kallus ağırlığı üzerindeki etkisi ile ilgili olarak ise, en ağır kallus 92.23 mg ortalama ağırlıkla 2. ortamda üretilmiştir. Kontrol ortamı sadece 2.05 mg ortalama ağırlıkla en hafif kallusları üretmiştir, bu da kallus büyümesini teşvik etmede ortam bileşiminin önemini ortaya koymaktadır (Çizelge 4.35).

Eksplant x genotip x indüksiyon interaksyonunu açısından en ağır kallus ortalama 219.90 mg ile 9. ortamda kültüre alınan Ceyhan-99 genotipinin yaprak eksplantlarında kaydedilmiştir. Diğer taraftan, en hafif kallus ortalama 4.98 mg ile kontrol ortamında kültüre alınan yine Ceyhan-99 genotipinin skutellum eksplantlarından elde edilmiştir (Çizelge 4.39.). Bu sonuç, aynı genotip içinde bile eksplant tipi ve indüksiyon ortamının kombinasyonunun kallus ağırlığında önemli farklılıklara yol açabileceğini göstermektedir. Bu bulgular, kallus ağırlığını optimize etmek için uygun eksplant tipi, genotip ve indüksiyon ortamının seçilmesinin önemini ortaya koymaktadır. Sonuç olarak yaprak eksplantı ve 2. ortam içeriğinin daha ağır kallus üretiminde daha etkili olduğu ifade edilebilir.

Çizelge 4.38. IV. grup somatik embriyogenesis denemelerinde eksplant x genotip x indüksiyon ortamı interaksiyonunun kallus ağırlığı (mg/kallus) üzerine etkileri*

İndüksiyon Ortamı	İndüksiyon Ortamlarında Kallus Ağırlıklarının Oluştığı Genotipler ve Eksplantları							
	Ceyhan-99		Sarıçanak		Svevo		Sagittario	
	Skutellum	Yaprak	Skutellum	Yaprak	Skutellum	Yaprak	Skutellum	Yaprak
1 (Kontrol)	4.98no	0.00	11.44m-o	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	48.45j-o	187.82ab	38.97j-o	185.51ab	13.00m-o	151.56a-f	49.88j-o	63.44g-o
3	27.20k-o	161.52a-d	31.09k-o	186.92ab	17.80l-o	179.91ab	33.15k-o	55.37i-o
4	33.68k-o	134.75b-g	30.66k-o	98.12d-k	17.89l-o	178.12a-c	27.52k-o	70.53g-o
5	34.02k-o	129.25b-h	69.93g-o	72.26g-n	22.29l-o	182.57ab	33.14k-o	73.56g-n
6	21.40l-o	124.85b-i	40.84j-o	70.80g-o	29.72k-o	72.78g-n	25.78l-o	77.70g-m
7	124.85b-i	156.51a-e	62.57h-o	124.85b-i	29.72k-o	69.73g-o	29.55k-o	63.07h-o
8	27.96k-o	156.51a-e	20.06l-o	172.30a-c	19.83l-o	71.25g-o	49.43j-o	49.92j-o
9	64.94g-o	219.90a	25.31l-o	164.34a-d	18.50l-o	88.85e-l	23.94l-o	82.34f-m
LSD (0.05)		71.66						
F değeri		1.379						
SE (+/-)		0.566						
Pr>F		0.10						
Önemlilik (P)		ÖD						
Genel ortalma		68.32						

* LSD testi ile ayrılan ortalamaları karşılaştırmak için üç yönlü ANOVA kullanılmıştır. Bir sütun içinde farklı harfle ifade edilen ortalamalar $p \leq 0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

4.2.4.2. Genotip, eksplant ve indüksiyon ortamı faktörlerinin yeşil nokta oluşumu, rejenerant bitki oranı ve kallus başına sürgün sayısı üzerine etkileri

IV. grup somatik embriyogenesis denemelerinde öncelikle 4 buğday genotipinin skutellum ve yaprak eksplantlarının her birisi temel besin ortamı Modifiye edilmiş CHB ortamı [CHB-3 ortamı (Chu vd. 1990)] olan ve 30 gr/L maltoz karbonhidrat kaynağı eklenmiş 9 farklı indüksiyon ortamında kültüre alınmıştır. Bu indüksiyon ortamlarında oluşan embriyojenik kalluslar rejenera olabilmeleri için 2 farklı rejenerasyon ortamına (Çizelge 3.12) aktarılmış, daha sonra bunlardan oluşan yeşil nokta sayısı, kallus başına sürgün sayısı ve rejenerant bitki sayısı verileri kaydedilmiştir. Bu rejenerasyon denemelerinde eksplant tipi, genotip ve rejenerasyon ortamı faktörlerinin yeşil nokta sayısı, kallus başına sürgün sayısı ve rejenerant bitki sayısı üzerindeki etkilerini belirlemek için üç yönlü varyans analizi yapılmıştır (Çizelge 4.40).

Çizelge 4.39. IV.Grup somatik embriyogenesis denemelerinde genotip, eksplant ve rejenerasyon ortamının yeşil nokta sayısı, kallus başına sürgün sayısı ve rejenerant bitki sayısı üzerine etkileri*

Faktörler	Kültüre Alınan Kallus Sayısı (Adet)	Yeşil Nokta Sayısı (Adet)	Kallus Başına Sürgün Sayısı (Adet)	Rejenerant Bitki Sayısı (Adet)
Eksplant Tipi				
Skutellum	893	18.45a	6.12a	0.80a
Yaprak	454	7.33b	1.88a	0.25a
LSD(0.05)		4.38	4.58	0.58
F value		25.23	3.344	3.56
Pr (>F)		0.06	0.06	0.06
SE (+/-)		0.554	0.579	0.073
Genotip				
Ceyhan-99	437	19.63a	3.05b	0.47ab
Sarıçanak	392	12.27b	1.66b	0.22b
Svevo	254	5.38c	1.66b	0.22b
Sagittario	354	13.27b	9.63a	1..199a
LSD(0.05)		6.19	6.48	0.82
F value		0,04	2.707	2.44
Pr (>F)		<0.00	0.04	0.06
SE (+/-)		0.391	0.409	0.052
Rejenerasyon Ortamı				
R1	714	15.66a	6.38a	0.84a
R2	723	1.12b	1.62b	0.20b
LSD(0.05)		4.35	4.58	0.58
F value		0,17	4.229	4.71
Pr (>F)		0.03	0.43	0.33
SE (+/-)		0.554	0.579	0.073
Önemlilik (P)				
Eksplant		***	ÖD	ÖD
Genotip		***	*	ÖD
Rejenerasyon Ortamları		*	*	*
Toplam	1437			
Genel ortalama		12.89	4,00	0.52

* LSD testi ile ayrılan ortalamaları karşılaştırmak için iki yönlü ANOVA kullanılmıştır. Bir sütun içinde farklı harfle ifade edilen ortalamalar p<0.05 düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

Çizelge 4.40' a göre yeşil nokta oluşumu yönünden, üç yönlü interaksiyon (P=0.87) için dikkate değer bir istisna dışında, eksplant tipi (P <0.001), genotip (P <0.001) ve rejenerasyon ortamının (P <0.05) önemli etkilerini göstermektedir. LSD test sonuçları bu bulguları daha da aydınlatmaktadır. Eksplant tipi için, skutellum eksplantları ortalama 18.45 yeşil nokta değerine sahipken, yaprak segmentleri ortalama 7.33 yeşil nokta değerine sahiptir. Bu, skutellum eksplantlarının yeşil nokta oluşumunda yaprak

segmentlerinden önemli ölçüde daha iyi sonuç verdiğine işaret etmektedir. Genotiplerin yeşil nokta oluşumuna etkisi incelendiğinde, LSD sonuçları genotipler arasında yeşil nokta oluşumunda açıkça önemli bir fark olduğunu göstermektedir; ortalama 19.63 ile Ceyhan-99 genotipi en fazla yeşil nokta oluşumunu sağlarken, ortalama 5.38 ile Svevo genotipi en az yeşil nokta oluşumunu göstermiştir. Rejenerasyon ortamının yeşil nokta oluşumuna etkisi yönünden; ModCHB-R1 rejenerasyon ortamı ModCHB-R2 rejenerasyon ortamından 2.52 kat daha fazla yeşil nokta üretmiştir, bu da ModCHB-R1 ortamının yeşil nokta oluşumunda ModCHB-R2 ortamından önemli ölçüde daha iyi performans gösterdiğini ortaya koymaktadır (Çizelge 4.40).

Eksplant x genotip x rejenerasyon interaksyonunun yeşil nokta sayısı, kallus başına sürgün sayısı ve rejenerant bitki sayısı üzerine etkileri Çizelge 4.41 de verilmiştir. Çizelge 4.41'e göre üç yönlü interaksyon, gözlemi alınan parametrelerin hiçbirisi üzerinde önemli bir fark oluşturamamıştır. Bununla birlikte, en yüksek yeşil nokta ortalaması (33.77) ModCHB-R1 rejenerasyon ortamında kültüre alınan Ceyhan-99 genotipinin skutellum eksplantlarında gerçekleşirken, en düşük yeşil nokta ortalaması (2.22) ModCHB-R2 rejenerasyon ortamında kültüre alınan Svevo genotipinin yaprak eksplantlarından üretilmiştir.

Çizelge 4.40. IV. Grup somatik embriyogenesis denemelerinde genotip x eksplant x rejenerasyon ortamı interaksyonunun yeşil nokta, kallus başına sürgün ve rejenerant bitki üzerine etkileri*

Genotip	Eksplant	Yeşil Nokta Sayısı (Adet)		Kallus Başına Sürgün Sayısı (Adet)		Rejenerant Bitki Sayısı (Adet)	
		Rejenerasyon Ortamları					
		R1	R2	R1	R2	R1	R2
Ceyhan-99	Skutellum	33.77a	22.66ab	9.77b	0.33b	1.55ab	0.11b
	Yaprak	15.77b-e	6.33d-f	2.11b	0.00b	0.22b	0.00b
Sarıçanak	Skutellum	21.44ab	11.11b-f	1.22b	0.33b	0.33b	0.11b
	Yaprak	17.00b-d	3.55ef	5.11b	0.00b	0.44b	0.00b
Svevo	Skutellum	7.55c-f	5.77d-f	2.88b	0.00b	0.33b	0.00b
	Yaprak	6.00d-f	2.22f	3.77b	0.00b	0.55b	0.00b
Sagittario	Skutellum	19.11bc	20.33b	23.33a	11.11ab	2.77a	1.22ab
	Yaprak	10.55b-f	3.11f	2.88b	1.22b	0.55b	0.22b
LSD(0.05)		12.39		12.96		1.64	
F value		0.23		0.555		0.502	
Pr>F		0.87		0.64		0.68	
SEm(+/-)		0.195		0.204		0.026	
Önemlilik (P)		ÖD		ÖD		ÖD	
Genel Ortalama		12.89		0.52		4.00	

* LSD testi ile ayrılan ortalamaları karşılaştırmak için üç yönlü ANOVA kullanılmıştır. Bir sütun içinde farklı harfle ifade edilen ortalamalar $p \leq 0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

4.2.5. Somatik embriyogenesis çalışmalarında karbonhidrat kaynaklarının kallus üretimi ve embriyojenik kallus oluşumu üzerine etkisi

Dört ana grupta yürütülen somatik embriyogenesis çalışmalarında daha önce belirtildiği gibi temel olarak farklı karbonhidrat kaynakları ve temel besin ortamlarına eklenen çeşitli kimyasallarla oluşturulan 9'ar indüksiyon ortamının (Çizelge 3.11) kallus ve embriyo oluşumu üzerine etkileri araştırılmıştır. Bunların dört gruptaki etkileri zaten yukarıda detaylı şekilde verilmiştir. Ancak özellikle karbonhidrat kaynağının önemine vurgu yapabilmek için bu bölümde sukroz ve maltozun kallus üretimi ve embriyojenik kallus oluşumu üzerindeki etkileri karşılaştırılmıştır.

Somatik embriyogenesis ana gruplarını hatırlatmak gerekirse; her biri 9 indüksiyon ortamı içeren 4 gruptan; I. ve II. gruplarda temel besin ortamı olarak ModMS ortamı kullanılırken, III. ve IV. gruplarda ModCHB ortamı kullanılmıştır. Bu gruplardaki ortamların karbonhidrat kaynağı olarak ise; I. ve III. gruplarda sukroz, III. ve IV. gruplarda maltoz kullanılmıştır. Bu karbonhidrat kaynaklarının kallus üretimi ve embriyojenik kallus oluşumu dahil olmak üzere somatik embriyogenesisin temel parametrelerini nasıl etkilediğini anlamak amacıyla varyans analizi yapılmıştır (Çizelge 4.42).

Çizelge 4.41. Somatik embriyogenesis denemelerindeki ortamlara eklenen karbonhidrat kaynaklarının kallus üretimi ve embriyojenik kallus oluşumu üzerine etkisi*

Karbonhidrat Kaynağı	Toplam Kallus (%)	Embriyojenik Kallus Oluşumu (%)
Sukroz	54.21a	34.79b
Maltoz	55.24a	39.27a
LSD (0.05)	1.65	1.70
F değeri	1.475	26.658
Pr > F	0.22	<0.001
Önemlilik (P)	ÖD	***
Genel	54.73	37.03

* LSD testi ile ayrılan ortalamaları karşılaştırmak için üç yönlü ANOVA kullanılmıştır. Bir sütun içinde farklı harfle ifade edilen ortalamalar $p \leq 0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

Çizelge 4.42'ye göre, karbonhidrat kaynağı toplam kallus üretimini önemli ölçüde etkilemezken ($F=1.475$, $P=0.22$), embriyojenik kallus oluşumu ($F=26.65$,

$P < 0.001$), üzerine önemli etkiye bulunmuştur. Karbonhidrat kaynakları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli olmamasına rağmen, maltoz (%55.24) sukroza (%54.21) kıyasla daha yüksek oranda kallus üretmiştir. Embriyojenik kallus oluşumu ile ilgili olarak ise LSD değeri 1.70 olup, maltoz (%39.27) sukrozdan (%34.71) daha fazla embriyojenik kallus üretmiştir.

Karbonhidrat kaynağı x eksplant tipi interaksyonunun kallus üretimi ve embriyojenik kallus oluşumu üzerindeki etkisini değerlendirmek üzere varyans analizi yapılmıştır (Çizelge 4.43).

Çizelge 4.42. Somatik embriyogenesis denemelerinde karbonhidrat kaynağı x eksplant interaksyonunun kallus üretimi ve embriyojenik kallus oluşumu üzerine etkileri*

Karbonhidrat Kaynağı	Toplam Kallus (%)		Embriyojenik Kallus (%)	
	Skutellum	Yaprak	Skutellum	Yaprak
Sukroz	73.40a	35.03b	41.18b	28.40c
Maltoz	74.89a	35.59b	54.54a	23.99d
LSD (0.05)	2.33		2.40	
F değeri	0.309		104.984	
Pr > F	0.57		<0.001	
Önemlilik (P)	ÖD		***	
Genel	54.73		37.03	

* LSD testi ile ayrılan ortalamaları karşılaştırmak için üç yönlü ANOVA kullanılmıştır. Bir sütun içinde farklı harfle ifade edilen ortalamalar $p \leq 0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

Çizelge 4.43'e göre, karbonhidrat kaynakları ve eksplant tipleri arasındaki interaksyon toplam kallus üretiminde önemli bir fark olmadığını ortaya koymuştur ($F=0.309$, $P=0.57$). Bununla birlikte, maltozlu ortamlarda kültüre alınan skutellum (ortalama %74.89) ve yaprak (ortalama %35.59) eksplantlarında sukrozlu ortamlarda kültüre alınan muadillerinden daha fazla kallus oluşmuştur.

Embriyojenik kallus üretimi yönünden ise karbonhidrat kaynağı ve eksplant interaksyonu önemli bulunmuştur ($F=104.984$, $P < 0.001$). Çizelge 4.43'e göre, en yüksek embriyojenik kallus üretimi ortalama %54.54 ile maltozlu ortamlarda kültüre alınan skutellum eksplantlarında gerçekleşmiştir. En düşük embriyojenik kallus üretimi ise ortalama %23.99 ile yine maltozlu ortamlarda kültüre alınan yaprak segmentlerinde

gözlenmiştir. Bu sonuçlar, embriyojenik kallus oluşumunda eksplant kaynağını önemini vurgulamaktadır.

Ayrıca, karbonhidrat kaynağı x genotip interaksiyonunun kallus üretimi ve embriyojenik kallus oluşumu üzerindeki etkisini değerlendirmek için de varyans analizi yapılmıştır (Çizelge 4.44).

Çizelge 4.43. Somatik embriyogenesis denemelerinde karbonhidrat kaynağı x genotip interaksiyonunun kallus üretimi ve embriyojenik kallus oluşumu üzerine etkileri*

Karbon- hidrat Kaynağı	Toplam Kallus Oluşumu (%)				Embriyojenik Kallus Oluşumu(%)			
	Ceyhan-99	Sarıçanak	Svevo	Sagittario	Ceyhan-99	Sarıçanak	Svevo	Sagittario
Sukroz	58.26b	57.70b	49.30	51.59cd	39.72bc	33.47ef	30.62f	35.34de
Maltoz	62.01a	60.41ab	45.20e	53.33c	46.31a	41.04b	32.08eff	37.63cd
LSD(0.05)	3.30				3.40			
F value	4.335				3.094			
Pr>F	<0.01				<0.05			
Önemlilik	**				*			
Genel	54.73				37.03			

* LSD testi ile ayrılan ortalamaları karşılaştırmak için üç yönlü ANOVA kullanılmıştır. Bir sütun içinde farklı harfle ifade edilen ortalamalar $p \leq 0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

Çizelge 4.44'e göre, toplam kallus oluşumu ($F=4.335$, $P<0.01$) ve embriyojenik kallus oluşumu üzerine ($F=3.094$, $P<0.05$) karbonhidrat kaynağı x genotip interaksiyonun etkisi önemli bulunmuştur. Toplam kallus oluşumunun LSD değeri 3.30 olup, en yüksek kallus üretimi, ortalama %62 ile karbonhidrat kaynağı olarak maltoz olan ortamlarda kültüre alınan Ceyhan-99 genotipinden elde edilmiştir. Buna karşılık, en düşük kallus üretimi ortalama %45.2 ile yine maltozlu ortamlarda kültüre alınan Svevo genotipinde oluşmuştur.

Embriyojenik kallus oluşumunun LSD değeri 3.40 olup, en yüksek embriyojenik kallus üretimi, ortalama %46.31 ile olarak maltozlu ortamlarda kültüre alınan Ceyhan-99 genotipinden, en düşük embriyojenik kallus üretimi ise ortalama %30.62 ile olarak sukrozlu ortamlarda kültüre alınan Svevo genotipinde gerçekleşmiştir (Çizelge 4.44).

Karbonhidrat kaynağı x eksplant x genotip faktörleri arasındaki üç yönlü interaksiyonun kallus verileri üzerine etkilerini belirlemek için de varyans analizi yapılmıştır (Çizelge 4.45).

Çizelge 4.44. Somatik embriyogenesis denemelerinde karbonhidrat kaynağı x eksplant x genotip interaksiyonunun kallus üretimi ve embriyojenik kallus oluşumu üzerine etkileri*

Genotip	Eksplant	Toplam Kallus Oluşumu (%)		Embriyojenik Kallus Oluşumu (%)	
		Sukroz	Maltoz	Sukroz	Maltoz
Ceyhan-99	Skutellum	79.86c	87.36a	49.58c	64.02a
	Yaprak	36.66gh	36.66gh	29.86f	28.61fg
Sarıçanak	Skutellum	81.80bc	84.58ab	39.44d	58.33b
	Yaprak	33.61hi	36.25gh	27.50fgh	23.75hi
Svevo	Skutellum	68.47d	57.36f	37.08e	43.05d
	Yaprak	30.13hi	33.05hi	24.16ghi	21.11i
Sagittario	Skutellum	63.47e	70.27d	38.61de	52.77c
	Yaprak	39.72g	36.38gh	32.08f	22.50i
LSD(0.05)		4.67		4.80	
F value		10.319		3.881	
Pr>F		<0.001		<0.01	
Önemlilik (P)		***		**	

* LSD testi ile ayrılan ortalamaları karşılaştırmak için üç yönlü ANOVA kullanılmıştır. Bir sütun içinde farklı harfle ifade edilen ortalamalar $p \leq 0.05$ düzeyinde anlamlı olarak farklıdır.

Çizelge 4.45'e göre, karbonhidrat kaynağı x eksplant x genotip faktörleri arasındaki üçlü interaksiyon toplam kallus oluşumu ($F=10.319$, $P<0.001$), hem de embriyojenik kallus oluşumu ($F=3.881$, $P<0.01$) üzerine önemli etkide bulunmuştur. Toplam kallus oluşumunun LSD değeri 4.67 olup, en yüksek kallus oluşumu Ceyhan-99 genotipinin maltozlu ortamlarda kültüre alınan skutellum eksplantlarından (%87.36) elde edilirken, en düşük kallus oluşumu Svevo genotipinin sukrozlu ortamlarda kültüre alınan yaprak eksplantlarından (%30.13) elde edilmiştir.

Embriyojenik kallus üretiminin LSD değeri ise 4.80 olup, en yüksek embriyojenik kallus oluşumu Ceyhan-99 genotipinin maltozlu ortamlarda kültüre alınan skutellum eksplantlarında (%64) gerçekleşirken, en düşük kallus oluşumu ise Svevo genotipinin maltozlu ortamlarda kültüre alınan yaprak eksplantlarında (%21.1) meydana gelmiştir (Çizelge 4.45).

4.3. TARTIŞMA

Bu çalışmada kullanılan *in vitro* androgenesis ve somatik embriyogenesis teknikleri ekmeklik ve makarnalık buğdayda çeşit geliştirmek ve bitki üretimini artırmak için kullanılan önemli potansiyele sahip biyoteknolojik yöntemlerdir. Buğdayda androgenesis ve somatik embriyogenesis başarısı; donör bitkilerin yetiştirilme koşulları, genotip bağımlılığı, kültür öncesi veya sonrası stres oluşturma amaçlı yapılabilen ön işlemler ve kullanılan indüksiyon ve rejenerasyon ortamlarının içerikleri gibi çeşitli faktörlere bağlıdır (Zhang vd. 2015; Zheng vd. 2003). Bu tez çalışmasında mikrospor ve somatik embriyogenesis süreçlerini etkileyen önemli bazı faktörlerin embriyoid/embriyo ve sürgün/bitki oluşumu üzerine etkilerinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

Tezin androgenesis çalışmaları bölümünde öncelikle embriyo indüksiyonu ve rejenerasyonu, albino ve yeşil bitki üretimi gibi androjenik tepkiler üzerinde önemli genetik varyasyon oluşturan çeşitli buğday genotiplerine (kışlık, yazlık, ekmeklik ve makarnalık buğday) odaklanılmıştır. Androgenesis başarısının endojen ve eksojen faktörlere bağlı olduğu kabul edildiğinde; endojen önemli olmaktadır (Segui-Simarro ve Nuez. 2008). Genotip bağımlılığı kapsamında farklı buğday genotipleri, androgenesis indüktörler arasındaki genotip, buğday androgenesis sürecinde kritik bir rol iyonuna ve bitki rejenerasyonuna farklı tepkiler gösterir (Maluszynski vd. 2003). Tezde üç grup halinde yürütülen androgenesis denemelerinde de buğday anter kültüründe genotip bağımlılığını gösteren benzer sonuçlar alınmıştır. Üç kışlık buğday genotipinin yer aldığı I. grup denemelerde; Altındane genotipi 100 anter başına 46.66 embriyoid verirken, Dariel genotipi 100 anter başına 1.3 embriyoid oluşturmuş, Pehlivan genotipi ise hiç embriyoid meydana getirmemiştir. Bu bulgular, genotipin buğday anter kültüründe embriyoid oluşumu ve bitki rejenerasyonunun başarısı üzerindeki önemli etkisini literatürle uyumlu şekilde tekrar vurgulamıştır. I. grup çalışmada elde edilen verilere göre, 100 anter başına oluşan ortalama embriyoid sayısı 16'nın üzerindedir. Bu sonuç, 100 anter başına 10 androjenik yapı elde eden Weight vd. (2019) ile 100 anter başına 7.8 kallus rapor eden El-Hennawy vd. (2011) tarafından bildirilen sonuçlardan daha yüksektir. Weight vd. (2020b) ise 100 anter başına 6 embriyo benzeri yapı elde etmiştir. Bu karşılaştırmalardaki sonuçlar, çalışılan genotiplerin değişkenliğinin önemini ve daha yüksek verimlilik potansiyelinin altını çizmektedir.

Çalışmanın sonuçlarına göre, yazlık buğday genotipleri kışlık genotiplere kıyasla androgenesise (hem anter hem de mikrospor kültürüne) daha yüksek tepki vermiştir, ki bu sonuç Khound vd (2013) 'nin üç yazlık ve üç kışlık buğday genotipi üzerinde mikrospor kültürü kullanarak yaptığı çalışmanın bulgularıyla uyumludur. Bu durum, yazlık buğday genotiplerinin mikrospor kültüründe daha yüksek başarı oranı gösterdiğini ortaya koymaktadır. Çalışmalarımızda tüm genotipler (hem yazlık hem de kışlık tipteki) mikrospor bölünmesine tepki göstermiştir. Genel olarak, makarnalık buğday androgenesise ekmeklik buğdaydan daha düşük tepki göstermektedir (Ghaemi vd. 1992). Bu durum, yazlık ekmeklik buğday genotiplerinin mikrospor bölünmesinin yazlık makarnalık buğday genotiplerinden daha yüksek tepki gösterdiği çalışmamızda da gözlemlenmiştir. Örneğin, II. grup androgenesis çalışmalarında yazlık ekmek buğdayı olan Ceyhan-99 genotipinde ortalama 27.77, III. grup çalışmalarda ise ortalama 32.70 mikrospor bölünmesi gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, makarnalık buğday genotiplerinden birisi olan Svevo genotipi de II. grup çalışmalarda mikrospor bölünmesi yönünden yüksek tepki vermiştir. Svevo genotipi 18 indüksiyon ortamından 11., 12. ve 16. ortamlar hariç diğer ortamların tamamında mikrospor bölünmesi gösterdiği için bu genotip androgenesise diğer makarnalık genotiplerden daha yüksek tepki vermiş gözükmektedir. Ancak, aynı genotip III. grup çalışmalarda indüksiyon ortamlarının çoğunda daha az mikrospor bölünmesi göstermiştir. Buna karşılık, Ceyhan-99 genotipi her iki deneyde de ortamların çoğunda yüksek mikrospor bölünmesi göstermiştir.

II. grup androgenesis çalışmalarında hem anter hem de mikrospor kültürlerindeki embriyoid üretimi, farklı genotiplerin (yazlık, kışlık, makarnalık ve ekmeklik tipteki) kullanımı nedeniyle I. grup denemelerden daha az olmuştur. II. grup denemelerden, 8 genotip arasından sadece 3 genotip embriyoid üretmiştir. Bunlardan birisi yazlık makarnalık buğday ve diğer ikisi yazlık ekmeklik buğdaydır. Kışlık buğday genotipleri ise hiç embriyoid üretmemiştir. Buna karşılık, I. grup denemelerde 3 kışlık ekmeklik buğday genotipi ile kullanılmış ve bunlardan ikisi embriyoid üretmiştir. III. grup denemelerde ise, II. grup denemelerde androgenesise tepki veren genotipler üzerinde durulmuş, bu nedenle genotip sayısı 8 den 4' e düşürülmüştür. Bununla birlikte, III. grup denemelerdeki embriyoid üretimi hem anter hem de mikrospor kültüründe tıpkı III. grup denemelerdeki gibi I. grup denemelerden daha düşük gerçekleşmiştir. Bu sonuçlar, bu

çalışmada da androgenesis yönünden güçlü bir genotip bağımlılığı olduğunu göstermektedir.

In vitro buğday androgenesis çalışmalarında yaşanan bir diğer zorluk albinizm olup, bu da büyük ölçüde genotipten kaynaklanmaktadır. Zira bazı genotiplerde %100 albinizm görülebilmektedir. Çalışmada albino ve yeşil bitki sayısı da genotiplerden etkilenmiştir. I. grup androgenesis denemelerinde en yüksek albino bitki üretimi Altındane genotipinde (8 adet/100 anter), en düşük ise Dariel genotipinde (0.44 adet/100 anter) gerçekleşmiştir. Yeşil bitki üretimi ise, 100 anter başına yaklaşık 0.8 yeşil bitki ile sadece Altındane genotipinde gerçekleşmiştir. Albinizm sorunu II. ve III. grup çalışmalarının hem anter hem de mikrospor kültürlerinde de gözlenmiştir. II. grup denemelerde mikrospor kültürlerinden hiç bitki üretilmemiş, ancak anter kültürlerinde sadece albino bitki üretimi gerçekleşmiştir. Ceyhan-99 genotipi ortalama 0.6/100 anter başına ile en yüksek sayıda albino bitki üretilen genotip olmuştur. III. grup denemelerde Ceyhan-99 genotipinde anter kültüründe ortalama albino bitki üretimi 0.06/100 anter başına olmuş ve aynı genotipin mikrospor kültürlerinden de aynı ortalama ile albino bitki gerçekleşmiştir. Neyse ki, III. grup mikrospor kültür denemelerde yine Ceyhan-99 genotipinden ortalama 0.03 ile yeşil sürgün elde edilmiştir. Buğday androgenesisinde yeşil bitki üretimi ile ilgili çalışan daha önceki araştırmacılar; Holm vd (1999) duyarlı genotipler kullanarak yeşil bitki verimliliğini artırırken (100 anterde 11,4), Broughton (2011) makro besin ile ön işlem uygulamasında Ca ile karıştırılmış n-bütanol kullanarak yeşil bitki verimini 100 anterde 0 dan 27 ye çıkartmıştır. Echávarri vd (2016) buğday anter kültüründe, ön işlem ortamına %1 DMSO eklemenin yeşil bitki sayısını 2 kat ila 4 kat artırdığını bildirmiştir. Ancak, çalışmamızda aynı DMSO dozunu indüksiyon ortamında kullandığımızda, sonuçları olumsuz etkilemiştir. İlginç bir şekilde, başakların yüzey dezenfeksiyonu için %1 lik DMSO kullanımı embriyoid üretimini % 0'dan % 46'ya çıkarmıştır. Bu bulgular, DMSO'nun androgenesisin ilk aşamasında kritik bir etkiye sahip olabileceğini göstermektedir, ki bu sonuç Sharafat vd. (2023) de paylaşılmıştır. Elde edilen bu sonuç, Echávarri vd. (2016) nin ön işlem ortamında DMSO kullandıklarında elde ettikleri olumlu sonuçlarla da uyumludur. DMSO uygulamasının zamanlaması ve konsantrasyonunun buğdayda androgenesis sonuçlarını optimize etmede oldukça önemli olduğu düşünülmektedir.

Androgenesis sürecini ve başarısını etkileyen bir diğer kritik faktör; kullanılan indüksiyon veya rejenerasyon ortamlarının bileşenleridir (Zheng. 2003). Çalışmaki farklı grup denemelerde kullanılan farkı besin ortamlarına bağlı olarak değişen sonuçlar gözlemlenmiştir. I. grup denemelerde, Modifiye MS ve modifiye CHB-3 dahil olmak üzere 5 farklı indüksiyon ortamı test edilmiştir. İlginç bir şekilde, başarılı sonuçlar yalnızca CHB-3 ortamından elde edilmiş olup, bu sonuç androgenesisin teşvik edilmesinde CHB-3 ortamının üstün etkinliğini ortaya koymuştur. Bu bulgu, Zheng (2003) in ortam bileşiminin önemine ilişkin gözlemleriyle de uyumludur. II. grup denemelerde çalışmanın kapsamı CHB-3 formülasyonuna dayalı olarak 18 farklı indüksiyon ortamı ile genişletilmiş ve tüm bu ortamlar mikrospor bölünmesini olumlu yönde etkilemiştir. Özellikle, 2., 3. ve 4. ortamlar en yüksek mikrospor bölünme oranlarını vermiştir. Bu ortamların performansı; ortamlardaki aktif karbon ve timentin varlığına bağlanabilir. Aktif karbon, eksplantlar tarafından salınabilecek veya kültür ortamında oluşabilecek inhibitör maddeleri adsorbe ederek bitki doku kültüründe çok önemli bir rol oynar. Ayrıca ortamın havalandırma ve ışık penetrasyonu gibi fiziksel özelliklerini geliştirerek genel kültür koşullarını iyileştirebilir (Pan ve Van Staden. 1998), II. grup androgenesis denemelerimizde, aktif karbonun ortama dahil edilmesi mikrospor bölünmesi ve gelişimi için daha elverişli bir ortam yaratmış gibi görünmektedir. Benzer şekilde, Vural ve Arı (2020) tarafından patlıcan anter kültürü üzerine yapılan çalışmada, aktif karbonun faydalı etkileri ortaya koyulmuştur. Söz konusu çalışmada 1 g/L aktif karbon ile birlikte 10 mg/L AgNO₃ ve karbonhidrat kaynağı olarak 90 g/L maltoz eklenmesiyle oluşan üçlü sinerjik etki, embriyo oluşumunu 290 embriyo/100 antere kadar önemli ölçüde artırmış ve sağlıklı bitkilerin büyümesini kolaylaştırmıştır. Araştırmamızdan ve patlıcan çalışmasından elde edilen bulgular, aktif karbonun tek başına veya diğer katkı maddeleriyle birlikte androgenesis sürecinin geliştirilmesine katkı sağlayabileceğine işaret etmektedir. Gelecek buğday androgenesis çalışmalarında, aktif karbonun yararlı etkilerini gösterdiği spesifik mekanizmalar daha fazla araştırabilir ve farklı genotiplerde androgenesis verimliliğini arttırmak için ortamdaki konsantrasyonu optimize edilebilir.

Bir antibiyotik olan timentinin etkinliği özellikle birçok transformasyon çalışmasında ortaya konulmuş olup, sadece kontaminasyonu önlemekle kalmamakta, aynı zamanda hücre büyümesini de teşvik ettiği için bitki gelişimine olumlu katkıda

bulunmaktadır. Ancak bu katkı timentinin ortamdaki konsantrasyonuna bağlı olabilir. Örneğin, çalışmada III. grubun anter kültürlerindeki 3. ve 4. indüksiyon ortamlarında daha fazla embriyoid oluşumu gözlenmiştir. Bu ortamların etkisi; içerdikleri yüksek konsantrasyondaki (3. ve 4. ortamlar için sırasıyla 150 mg/L ve 200 mg/L) timentin varlığına bağlanabilir. Çünkü timentinin olmadığı veya düşük konsantrasyonda (75 mg/L) olduğu ortamlarda ya hiç ya da daha az embriyo oluşmuştur (Çizelge 4.8 ve Çizelge 4.9). Dolayısıyla, indüksiyon ortamlarındaki yüksek timentin konsantrasyonları, anter kültüründe embriyoid üretimini destekliyor gibi görünmekte, bu da timentin için doza bağlı bir tepkiye işaret etmektedir. Çalışmada timentin kullanımı ile elde edilen olumlu bulgular, Asif vd. (2013b) nin araştırmasında sefotaksim antibiyotiğinin hücre büyümesini teşvik ettiğini ve yeşil bitki üretimini artırdığını bildirdiği bulgularla uyumludur. Antibiyotiklerin kontaminasyonu azaltırken bitki büyümesini teşvik etmedeki rolü, androgenesis protokollerini optimize etmek için pratik etkileri olan dikkat çekici bir gözlemdir. Timentin veya sefotaksim gibi antibiyotiklerin besin ortamlarına dahil edilmesiyle daha yüksek mikrospor bölünmesi, daha yüksek embriyoid ve yeşil bitki üretiminin önü açılabilir, dolayısıyla androgenesis verimliliği önemli ölçüde arttırılabilir (Randhawa vd. 2013). Farklı içerikteki besin ortamlarının buğday androgenesisindeki embriyoid üretimi üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmanın II. ve III. grup denemelerdeki tüm ortamlara 10 mg/L arabinogalaktan ilave edilmiştir. Arabinoz ve galaktoz monosakkaritlerinden oluşan bir biyopolimer olarak bilinen arabinogalaktan, mikrospor ölümlerini önemli ölçüde azaltarak androgenesis sonuçları üzerinde olumlu etki sağlayabilmektedir (Letarte vd. 2006). Bununla birlikte, II. grup denemelerdeki indüksiyon ortamlarında arabinogalaktan bulunması mikrospor bölünmesi ve embriyoid üretimi arasında bir korelasyon göstermemiştir. Letarte vd. (2006), indüksiyon ortamına 10 mg/L arabinogalaktan eklediğinde ortalama 69 ile en yüksek mikrospor bölünmesini elde ederek benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Ancak, aynı genotip ve ortamdan ortalama 0.5 embriyoid elde etmişlerdir.

Tezde androgenesis çalışmalarının dışında, androgenesis denemelerinde olumlu tepki gösteren 4 buğday genotipinin somatik embriyogenesis tepkilerinin de belirlenmesi için kapsamlı çalışmalar yapılmıştır. Tezin somatik embriyogenesis çalışmaları dört ana grupta yürütülmüştür. Ana grupların temel farklılığı; kullanılan indüksiyon ortamlarının temel besin ortamları ve karbonhidrat kaynaklarının farklılığından kaynaklanmaktadır.

Bu gruplarda söz konusu 4 genotipin her birisinin olgun skutellum ve yaprak eksplantlarını 9 farklı indüksiyon ortamında kültüre alarak, daha sonra da bunlardan oluşan yapıları 2 farklı rejenerasyon ortamında kültüre alarak etkili bir somatik embriyogenesis protokolünün oluşturulması amaçlanmıştır.

Buğday somatik embriyogenesisi, buğday ıslahı için önemli bir biyoteknolojik yöntem olup, özellikle genetik transformasyon çalışmalarına önemli katkı sağlamaktadır. Somatik embriyogenesis, somatik hücrelerden somatik embriyoların üretildiği doğal bir fenomendir. Somatik embriyogenesis, gametik füzyon olmadan somatik hücrelerden embriyo benzeri yapılar üretmeyi sağlar ve bu süreç, düşük kimeraz sıklığı, yüksek sayıda rejenerant ve sınırlı somaklonal varyasyon ile sonuçlanır (Kahriz ve Kahriz. 2017). Bu yöntem, klonal bitki çoğaltımı için en etkili biyoteknolojik yol olarak kabul edilmekte ve genetik transformasyon çalışmaları ve çeşitlerin hızlandırılmış kitlesel üretimi için etkili bir araç sunmaktadır (Ramírez-Mosqueda. 2022). Somatik embriyogenesis doğrudan veya dolaylı yolla gerçekleşebilir. Direkt somatik embriyogenesisde kallus fazına gerek duyulmazken, indirekt somatik embriyogenesis embriyo gelişiminden önce kallus oluşumunu içermektedir (Ahmadpour vd. 2017b).

Somatik embriyogenesis sürecinde çeşitli faktörler önemli rol oynamaktadır. Bu faktörler arasında genotip, eksplant tipi, karbonhidrat kaynağı, kültürel/çevresel koşullar, ışık kalitesi ve yoğunluğu, çözünmüş oksijen (DO) seviyesi, hücre yoğunluğu, bitki gelişim düzenleyicileri (BGD) (oksin ve sitokinin) sinyali, BGD-gen interaksyonu ve uygulanan stresler sayılabilir (Yadav vd. 2020; Zhang vd. 2015).

Genotip faktörü; somatik embriyogenesis sürecinde çok önemli bir rol oynayarak kallus indüksiyonu, bitki rejenerasyon oranı ve rejenere edilen ortalama sürgün sayısını etkileyebilmektedir (Kopertekh ve Stribnaya. 2003; Ekom vd. 2013). Buğday ve arpa gibi çeşitli tahıl türleri üzerine yapılan araştırmalar, farklı genotiplerin *in vitro* kültüre farklı tepkiler gösterdiğini ve somatik embriyogenesisin başarı oranlarını etkilediğini göstermiştir. Bazı genotipler diğerlerine göre daha yüksek rejenerasyon tepkileri ve sürgün sayıları oluşturmaktadır (Parmar vd. 2012). Somatik embriyogenesis üzerine yaptığımız tüm denemelerde, kallus üretimi genotipten önemli ölçüde etkilenmiştir. Ekmeklik buğday genotipleri, makarnalık genotiplere kıyasla daha yüksek miktarlarda kallus üretmiştir. Bu sonuç, ekmeklik buğdayın olgun embriyolarından %100 kallus üreten Aydın vd. (2016)' nin bulguları ile olgun skutellum eksplantını kullanan Parmar

vd. (2012)'nin bulgularıyla uyumludur. Buna karşılık, Mouiamrine vd. (2012) makarnalık buğdayın olgun embriyolarından %93 ile en yüksek kallus üretim oranını bildirmiştir. Tezde elde edilen kallus bulguları, kallus üretiminin genotipe bağımlılığını gösteren bu çalışmalarla benzerlik göstermektedir.

Embriyojenik kallus üretimi ile ilgili olarak, Aydın vd. (2016) ekmeklik buğdayın olgun embriyolarından %90-100 gibi yüksek bir kallus oranı bildirirken, Mouiamrine vd. (2012) makarnalık buğdayın olgun embriyolarından %4.66-52 aralığında kallus oluşumu bildirmiştir. Çalışmamızın III.grup somatik embriyogenesis denemelerinde makarnalık buğday çeşidi olan Svevo genotipinin skutellum eksplantları ile ekmeklik buğday genotipi Ceyhan-99 genotipinin skutellum eksplantları 5. indüksiyon ortamında (2.5 mg/L Pikloram + 10 mg/L arabinogalakten + 500 mg/L glutamin + 1650 mg/L NH₄NO₃ içeren) aynı oranda (%80) embriyojenik kallus üretmiştir (Çizelge 4.30). Bu sonuç, bazı makarnalık buğday genotiplerinin de farklı çevre koşullarında ekmeklik buğday genotipleri ile aynı miktarda embriyojenik kallus üretebileceğini göstermektedir.

IV. grup somatik embriyogenesis denemelerinde genotipin hem kallus boyutu hem de ağırlığı üzerinde kayda değer bir etkisi olduğu ortaya çıkmıştır. Özellikle, ekmeklik buğday genotipi olan Ceyhan-99, diğer makarnalık buğday genotiplerine kıyasla daha büyük ve daha ağır kalluslar üreterek kallus gelişimi açısından üstün performans göstermiştir. Bu bulgu, hücre büyümesini ve farklılaşmasını etkileyen genetik faktörlere bağlanabilen doku kültürü yanıtlarında, genotipe özgü varyasyonlara ilişkin bildirilen önceki çalışmalarla uyumludur. Buna karşılık, II. grup denemelerde Svevo ve III. grup denemelerde Sagittario hariç, çoğu makarnalık buğday genotipi daha küçük ve daha hafif kallus üretmiştir. Bu istisnalar, genotipin kallus gelişiminde önemli rol oynarken, makarnalık buğday kategorisindeki belirli genotiplerin kallus oluşturma kapasitelerini de arttıran özelliklere sahip olabileceğine işaret etmektedir. I. grupta, genel olarak hem makarnalık hem de ekmeklik genotipin skutellum eksplantlarında belirlenen ortalama kallus boyutu 3.52 mm olup, makarnalık buğdayın olgun embriyolarından daha büyük kallus boyutları elde eden Ekom vd. (2013) tarafından bildirilen bulgulardan daha düşüktür. Bu farklılık, deneme koşullarına veya kültür ortamları içeriğindeki farklılıklara bağlanabilir. Çalışmada ayrıca, ekmeklik buğdaydaki kallus ağırlığı makarnalık buğdaya kıyasla daha yüksek bulunmuştur. En yüksek ortalama kallus ağırlığı IV. grup denemelerde 86 mg olarak belirlenmiştir. Ancak bu değer, Ekom vd. (2012) tarafından

bildirilen değerlerden daha düşüktür. Çalışmamızda gözlemlenen daha düşük kallus ağırlığı, farklı genotip ve eksplant tiplerinin kullanılmasına bağlanabilir.

Çalışmada ayrıca yeşil nokta, kallus başına sürgün ve rejenerant bitki oluşumunda da genotipe bağlı varyasyonlar ortaya çıkmıştır. Özellikle ekmeklik buğday genotipleri, Ceyhan-99 başta olmak üzere, çeşitli ölçütlerde daha iyi performans göstermiştir. III. grup somatik embriyogenesis denemelerinde, Ceyhan-99 ortalama 20.02 yeşil nokta üretimi göstermiştir. Buna karşılık, III. grup denemelerde sadece Svevo makarnalık buğday genotipi ortalama 22.44 ile yeşil nokta üretiminde daha yüksek sonuçlar göstermiştir. Kallus başına sürgün ve rejenerant bitki oluşumu yönünden de genotipler farklı tepkiler vermiştir. Kallus başına sürgün açısından, Ceyhan-99 genotipi ortalama 17.97 sürgün ile dikkate değer sonuç göstermiştir. Bu değer, Yadav vd. (2020) tarafından bildirilen olgun skutellum eksplantlarından kallus başına elde edilen 5 sürgün ile olgunlaşmamış skutellum eksplantlarından kallus başına üretilen 15 sürgün değerinden daha yüksektir. Kallus başına rejenerant bitki oluşumu yönünden ise kallus başına ortalama 3.52 rejenerant bitki ile en yüksek rejenerant bitki sayısı Ceyhan-99 genotipinde kaydedilmiştir. Bu sonuç ise, kallus başına en yüksek rejenerant bitki sayısının 2.9 olduğu Aydın vd. (2016) nin bulgularını geride bırakmaktadır. Tüm bu bulgular, buğdayda genotipin somatik embriyogenesis tepkileri üzerindeki önemli etkisini ortaya koymaktadır. Çalışmada ekmeklik buğday genotiplerinden özellikle Ceyhan-99; yeşil nokta üretimi, kallus başına sürgün ve rejenerant bitki oluşumu açısından makarnalık buğday genotiplerinden sürekli daha iyi performans göstermiştir. Bu durum, bazı ekmeklik buğday genotiplerinin somatik embriyogenesis tepkilerini arttıran doğal genetik avantajlara sahip olabileceğini göstermektedir.

Farklı doku kültürü tekniklerinde başlangıç kültür materyali olarak kullanılan eksplantlar, bir bitkinin farklı kısımları olabilir. Eksplant tipi *in vitro* somatik embriyogenesisde de kallus indüksiyonu ve sonraki bitki rejenerasyon işlemlerinin başlatılmasında önemli bir role sahiptir (Saha vd. 2017). Somatik embriyogenesis çalışmalarında farklı eksplant kaynakları kullanılırken, bunlar arasından seçilecek eksplant tipi somatik embriyogenesis sürecinin başarısını ve verimliliğini etkileyebilir.

Çalışmada skutellum ve yaprak olmak üzere iki tip eksplant kullanılmış olup, genel olarak skutellum eksplantı kallus üretimi, embriyojenik kallus üretimi, kallus boyutu, yeşil nokta, kallus başına sürgün ve rejenerant bitki oluşumu açısından yaprak eksplantına

kıyasla daha yüksek tepki ve daha iyi sonuçlar vermiştir. Sadece kallus ağırlığı açısından yaprak eksplantı daha yüksek performans göstermiştir. Yaprak eksplantları ortalama 107.07 mg ile en ağır kallusu IV. grup denemelerde oluşturmuştur. Bu değer II. grup denemelerde skutellum eksplantlarından oluşan ortalama 27.54 mg ağırlığa sahip kalluslardan yaklaşık 4 kat daha yüksektir. Bu bulgu, skutellum eksplantlarının somatik embriyogenesinin diğer parametrelerinde (kallus üretimi, embriyojenik kallus üretimi ve rejenerasyon gibi) genellikle daha yüksek etkinlik gösterirken, yaprak parçalarının daha ağır kallus üretiminde belirgin bir avantaja sahip olduğunu göstermektedir. Yaprak eksplantından daha ağır kallus üretiminin nedeni belki besin emilimi, doku yapısı veya metabolik aktivitedeki farklılıklara atfedilebilir olmakla birlikte, bu konu daha fazla araştırmayı gerektirmektedir.

Bu ağır kütleli kalluslar özellikle sekonder metabolitlerin incelenmesi ve *in vitro* koşullarda üretilmesi için de faydalı olabilir. Sekonder metabolit üretimi genellikle önemli miktarda biyokütle gerektirdiğinden, yaprak eksplantlarından elde edilen daha büyük kallus kütlesi bu tür çalışmalar için uygun ve yeterli materyali sağlayabilir. Bu nedenle, sekonder metabolit çalışmalarını kolaylaştırabilecek ve geliştirebilecek daha ağır kallus üretmek için yaprak eksplantlarının kullanılması önerilebilir.

Bu bulgular, eksplant kaynağının somatik embriyogenesis süreci üzerindeki önemli etkisini göstermektedir. Eksplant tipi açısından en yüksek kallus üretimi II. denemelerde %81.38 ile skutellum eksplantlarında gerçekleşmiş olup, bu sonuç olgun skutellumdan %80 kallus üretimi bildiren Yadav vd. (2020) nin bulgularıyla uyumludur. Yaprak eksplantlarından en yüksek kallus üretimi ise II. grup denemelerde %39.65 olarak belirlenmiştir. Yaprak eksplantlarını kullanan Yu vd. (2012) de %26.3-81 aralığında kallus üretimi bildirmiştir.

Kalluslarda yeşil nokta oluşumu yönünden en yüksek değer II. grup somatik embriyogenesis denemelerinde skutellum eksplantlarından elde edilen %29.97 olup, bu değer Yadav vd. (2020) tarafından elde edilen %67'den daha düşüktür. Kallus başına en yüksek ortalama sürgün sayısı I. grup denemelerde skutellum eksplantlarından elde edilen 16.27 olup, bu değer Yadav vd. (2020) tarafından olgun skutellumlardan bildirilen kallus başına 4.5 sürgünden önemli ölçüde yüksektir. Bu karşılaştırmalar; buğdayda somatik embriyogenesinin farklı parametreleri için farklı eksplantların kullanılması gerektiğini,

örneğin bu çalışmada olduğu gibi kallus başına en yüksek ortalama sürgün sayısı eldesi için yaprak yerine skutellum eksplantlarının kullanılabileceğini ortaya koymaktadır.

Kültür ortamı içeriği; somatik embriyogenesisde kallus indüksiyonu, embriyojenik kallus üretimi ve rejenerasyon süreçlerini etkileyen son derece önemli başka bir faktördür. Farklı ortam içerikleri örneğin spesifik tuzlar, özellikle 2,4-D, IAA gibi oksin tiplerini de içeren BGD ler, sükroz veya maltoz gibi karbonhidrat kaynakları; kallus başlatma, çoğaltma ve rejenerasyonun başarı oranlarını ciddi şekilde etkilemektedir (Bouiamrine vd. 2012; Mostade vd. 2001; Kopertekh ve Stribnaya. 2003; Miroshnichenko vd. 2016; Miroshnichenko vd. 2013). Yaptığımız ortam denemeleri ortam içeriğinin buğdayda somatik embriyogenesis verimliliğini önemli ölçüde etkilediğini ortaya koymuştur. Farklı ortamların karşılaştırmalı analizi, bitki doku kültüründe çeşitli amaçlar için koşulların optimize edilmesine yönelik öngörü sağlamaktadır.

Temel besin ortamı Modifiye MS ortamı ve karbonhidrat kaynağı 30 g/L sukroz olan I. grup somatik embriyogenesis denemelerindeki 9 indüksiyon ortamından; 5 mg/L Pikloram ve 10 mg/L arabinogalakten içeren 9.ortam %68.12 ile en yüksek kallus üretimini sağlamıştır. Aynı ortam aynı zamanda en yüksek kallus ağırlığı ve kallus boyutunu oluşturmuştur. Bu sonuç, Pikloram ve arabinogalakten kombinasyonunun söz konusu parametreleri geliştirmede etkili olduğunu göstermektedir. Buna karşılık, 2,5 mg/L 2,4-D içeren 2. ortam en yüksek embriyojenik kallus üretimini sağlamıştır (%56.25). Bu durum, arabinogalakten içeren Pikloram'ın genel kallus büyümesini ve biyokütleyi teşvik ederken, 2,4-D'nin embriyojenik kallus üretiminde daha etkili olduğunu ortaya koymuştur. Bulgular, farklı oksin tiplerinin embriyojenik kallusların gelişiminde farklı roller oynadığını göstermektedir.

I. grup denemelerdeki sukroz miktarının (30 g/L) aynı miktarda maltoz ile değiştirildiği II. grup somatik embriyogenesis denemelerinde; 9 indüksiyon ortamının tümü sukrozlu olan rakiplerine kıyasla daha yüksek kallus üretimi, embriyojenik kallus oluşumu ve benzer kallus boyutları göstermiştir. Bu durum, maltozun kallus gelişimini teşvik ederek hem kallus hem de embriyojenik kallus üretimini arttırabileceğini ortaya koymuştur. Maltoz içeren ortamlar arasında önemli farklılıkların olmaması ve kontrol ortamının kayda değer farklılıklar göstermesi, maltozun buğdayda somatik embriyogenesisi teşvik etmede yararlı bir karbonhidrat kaynağı olabileceğine işaret etmektedir.

Temel besin ortamı Modifiye CHB ortamı [CHB-3 ortamı (Chu vd. 1990)] ve karbonhidrat kaynağı 30 g/L sukroz olan III. grup somatik embriyogenesis denemelerindeki 9 indüksiyon ortamından; 3., 5., 8. ve 9. ortamlarda kallus üretimi daha yüksek gerçekleşmiştir (%62.8 ile %64 arasında değişen oranlarda). En yüksek embriyojenik kallus üretimi ise %46.56 ile 2.5 mg/L Pikloram ve 10 mg/L arabinogalaktan içeren 5. ortamda meydana gelmiştir. En büyük kallus boyutları 3. ve 8. ortamlarda, en yüksek kallus ağırlığı ise 6. ortamda olmuştur.

III. grup denemelerdeki sukroz miktarının (30 g/L) aynı miktarda maltoz ile değiştirildiği IV. grup somatik embriyogenesis denemelerinden alınan ortam sonuçları III. grup denemelerin sonuçlarına kıyasla önemli ölçüde iyileşmiştir. Bu etki maltozun yavaş metabolize olması nedeniyle kültür ortamının yüksek ve sabit osmolaritesini korumasına bağlanabilir (Malik vd. 2017). En fazla embriyojenik kallus 5. ortamda (%52,81) (2.5 mg/L Pikloram ve 10 mg/L arabinogalaktan içeren) meydana gelmiştir. Ayrıca, diğer ortamlara kıyasla yine 5. ortamda oluşan daha büyük kallus boyutu (ortalama 2.56 mm), maltozun kallus gelişimi üzerindeki olumlu etkisini vurgulamakta ve maltozun hem kallusun embriyojenik potansiyelini hem de boyutunu arttırmak için daha iyi bir karbonhidrat kaynağı olabileceğini düşündürmektedir. En ağır kallus ise 9. ortamda (ortalama 86 mg ağırlık) (5 mg/L Pikloram ve 10 mg/L arabinogalaktan içeren) oluşmuştur. 9. ortam ile kallus ağırlığındaki önemli artış; maltozlu ortamda biyokütle birikimi için daha yüksek Pikloram konsantrasyonu ile birlikte arabinogalaktan kombinasyonu etkinliğinin altını çizmektedir.

Çalışmada genel olarak, karbonhidrat kaynağı olan maltoz (%39.27) sukroza (%34.79) kıyasla daha yüksek oranda embriyojenik kallus oluşumu sağlamıştır. Bu bulgu, maltozun buğday somatik embriyogenesisinde kallus indüksiyonunu teşvik etmede daha etkili olabileceğine işaret etmektedir. Yapılan istatistik analizler; skutellum eksplantlarının maltozlu ortamlarda kültüre alındığında embriyojenik kallus oluşumu yönünden yaprak eksplantlarından önemli şekilde daha üstün performans sergilediğini, ortaya koymuştur. Genotip x karbonhidrat kaynağı interaksyonunda, en yüksek embriyojenik kallus oluşumu maltozlu ortamlarda kültüre alınan Ceyhan-99 genotipinden elde edilmiştir (Çizelge 4.44) Eksplant x genotip x karbonhidrat kaynağının üç yönlü interaksyonu açısından ise ortamlarda karbonhidrat kaynağı olarak maltoz kullanıldığında en yüksek embriyojenik kallus oluşumu Ceyhan-99 genotipinin skutellum

eksplantlarından (%64) elde edilmiştir. Bu bulgular, buğdayda somatik embriyogenesis ortamlarının optimize edilmesi sırasında uygun karbonhidrat kaynağı seçiminde genotipe ve eksplanta özgü tepkilerin de dikkate alınmasının önemini göstermektedir. Elde edilen bu bulgular, Malik vd. (2017)'nin üç karbonhidrat kaynağını (sukroz, glukoz ve maltoz) test ettikleri ve maltozun somatik embriyogenesis sürecini olumlu yönde etkilediği bulgusuyla uyumludur.

Arabinogalaktan (AG), batı karaçamından (*Larix occidentalis*) elde edilen polisakkarit ve arabinogalaktan proteinleri (AGP'ler), polisakkarit yan zincirleri ile D-galaktopiranoz kalıntılarından oluşan benzer bir omurgayı paylaşmaktadır. Yapısal benzerliklerine rağmen, önemli bir fark, AG'de fiziksel-kimyasal özelliklerinde farklılıklara yol açabilecek bir protein içeriğinin bulunmamasıdır. Hem AG hem de AGP'lerin androgenesisde önemli rol oynadığı, AG ve AGP'nin mikrospor ölümlerini azalttığı (Letarte vd. 2006) ve AGP'nin buğday somatik embriyogenesisini ve bitki rejenerasyonunu arttırdığı (Zhang vd. 2015) ortaya konulmuştur. Bu bilgilere dayanarak, çalışmada AG'nin buğday somatik embriyogenesisi üzerindeki etkileri araştırılmış, bunun için 4 grubun tümünde 3., 5., 7. ve 9. ortamlara 10 mg/L AG ilave edilmiştir. Bildiğimiz kadarıyla, buğdayda somatik embriyogenesis için AG'nin kullanıldığı herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmanın sonuçları, farklı deneme gruplarının farklı indüksiyon ortamlarında AG'nin kallus üretimini, embriyojenik kallus oluşumunu ve bitki rejenerasyonunu olumlu yönde etkilediğini göstermiştir. Mod-MS li ve sukrozlu I. grup denemelerdeki AG içeren tüm ortamlar; kontrol ortamı ve AG içermeyenlere kıyasla daha fazla kallus üretimi ve embriyojenik kallus oluşumu sağlamıştır. Özellikle 9. ortamda (5 mg/L Pikloram ve 10 mg/L AG içeren) %68.12 ile en yüksek kallus üretimi gerçekleşmiştir. Bu ortamlardaki AG varlığı muhtemelen hücre bölünmesini ve farklılaşmasını teşvik ederek bu sonuçların oluşumuna katkıda bulunmuştur. Çalışmadaki en fazla embriyojenik kallus oluşumu (%52.8) ve en ağır kallus (ortalama 86 mg ağırlık) oluşumu Mod-CHB li ve maltozlu IV. grup denemelerin sırasıyla 5. ve 9. ortamlarında gerçekleşmiştir. Bu sonuçlar daha önce belirtildiği gibi AG'nin daha yüksek Pikloram konsantrasyonları ile birleştirildiğinde, özellikle maltoz içeren ortamlarda biyokütle birikimini ve embriyojenik potansiyeli önemli ölçüde artırdığını göstermektedir. Ayrıca, AG'nin androgenesis sırasında mikrospor bölünmesindeki olumlu rolü, önceki çalışmalarımızda gösterildiği gibi, bitki doku kültürü süreçlerinin verimliliğini artırmada

daha geniş bir uygulama önermektedir. AGP literatürde daha kapsamlı bir şekilde çalışılmış olsa da, AG ile ilgili çalışmada elde edilen bulgular, buğdayın somatik embriyogenesi için potansiyel faydaları hakkında yeni bilgiler sağlamaktadır.

Buğday somatik embriyogenesi denemelerinde ayrıca farklı rejenerasyon ortamlarının kalluslarda yeşil nokta oluşumu, kallus başına sürgün ve rejenerant bitki üretimi üzerindeki etkinliğinin değerlendirilmesi de amaçlanmıştır. Bunun için kinetin ve zeatinin performansı karşılaştırılmıştır. I. grup denemelerde; kalluslar ModMS-R1 (1 mg/L BAP, 3 mg/L kinetin ve 500 mg/L glutamin içeren) ve ModMS-R2 (1 mg/L BAP, 3 mg/L Zeatin ve 500 mg/L glutamin içeren) ortamlarına aktarılmıştır. Her iki ortam da önemli bir fark göstermeden yeşil noktalar üretmiştir. Kallus başına sürgünler için, her iki ortam da eşit performans göstermiş ve kallus başına yaklaşık 10 sürgün üretmiştir. Ancak ModMS-R1, ModMS-R2 ye kıyasla daha yüksek ortalama rejenerant bitki (2.12) üretmiştir. Bu, kinetin in bitki rejenerasyonunu Zeatin den daha etkili şekilde arttırdığını göstermektedir. Sukrozun yerini maltozun aldığı II. grup denemelerde; hem ModMS-R1 hem de ModMS-R2 yeşil nokta oluşumunda, kallus başına sürgün sayısı ve rejenerant bitki oluşumunda önemli bir farklılık göstermemekle birlikte tüm ortamlar benzer kallus boyutlarında daha yüksek miktarda kallus ve embriyojenik kallus üretmiştir. III. grup denemelerde, kalluslar ModCHB-R1 (1 mg/L BAP, 3 mg/L kinetin ve 500 mg/L glutamin içeren) ve ModCHB-R2 (1 mg/L BAP, 3 mg/L Zeatin ve 500 mg/L glutamin içeren) ortamlarına aktarılmıştır. ModCHB-R1, ModCHB-R2 ye kıyasla önemli ölçüde daha yüksek ortalama yeşil nokta sayısı (18.86), kallus başına sürgün (3.93) ve rejenerant bitki (0.86) üretmiştir. Bu sonuçlar, buğday eksplantlarında sürgün rejenerasyonunu ve gelişimini teşvik etmede kinetinin zeatine göre üstün etkinliğini göstermektedir. Sukrozun yerini maltozun aldığı IV. grup denemelerde de benzer sonuçlar gözlenmiştir. ModCHB-R1, ModCHB-R2 ye kıyasla yine daha yüksek sayıda ortalama yeşil nokta (15.66), kallus başına sürgün(6.38) ve rejenerant bitki (0.84) üretmiştir. Bu durum, kinetinin BAP ile birlikte buğdayda somatik embriyogenesi ve rejenerasyonu arttırmada Zeatinden daha etkili olduğunu doğrulamaktadır. Yadav vd. (2020) ise buğday somatik embriyolarının rejenerasyon ortamında dicamba (0.1 mg/L) ve Zeatin (5 mg/L) kullanmış ve daha yüksek rejenerasyon oranları elde etmiştir. Bunun nedeni Yadav vd. (2020) nin yüksek düzeyde zeatin konsantrasyonu kullanmalarından kaynaklanabilir.

Somatik embriyogenesis denemelerinde kallus indüksiyon ortamından rejenerasyon ortamına transfer edilerek embriyojenik kallus gelişimi sağlanmıştır. Bir hafta sonra, bu kalluslar küçük sürgünler oluşturmuş ve kök varlığına bağlı olarak daha sonra farklı ortamlara aktarılmıştır. Kökleri gelişmeye başlayan *in vitro* bitkicikler BGD içermeyen Westvaco WV5 (Coke 1995) ortamına aktarılırken, kökleri olmayanlarsa 2 mg/L NAA içeren aynı ortama yerleştirilmiştir. Küçük sürgünlere sahip tüm transfer edilen kalluslar başarılı bir şekilde tam bitkiciklere dönüşmüştür. Westvaco ortamı, özellikle de WV5 bazal besin ortamı geleneksel olarak loblolly çamı (*Pinus taeda*) kültürü için kullanılmaktadır. Çam türlerinde eksplant canlılığını, sürgün üretimini, büyümeyi ve köklenmeyi arttırdığı bilinmektedir (Coke 1996). Bildiğimiz kadarıyla WV5 ortamı buğday somatik embriyogenesisinde şimdiye kadar kullanılmamıştır. Bu çalışmada buğday bitkisi rejenerasyonu için WV5 in başarılı şekilde kullanımı, söz konusu ortamın geleneksel kullanımının ötesinde potansiyel uygulanabilirliğini ortaya koymakta ve farklı türlerde rejenerasyon süreçlerini geliştirmek için uyarlanabilirliğini göstermektedir.

Sonuç olarak bu çalışma ile buğdayda androgenesis ve somatik embriyogenesis için etkili ortamların optimize edilmesinde gerekli olabilecek çeşitli bileşenlerin önemini altı çizilmiştir. Örneğin timentin, Ceyhan-99 genotipinde yeşil sürgünlerin gelişimini teşvik etmede çok değerli olduğunu kanıtlayarak bakteriyel kontaminasyonu azaltmada ve bitki rejenerasyonunu desteklemede etkinliğini göstermiştir. Bir karbonhidrat takviyesi olan arabinogalaktan ilavesi, kallus indüksiyonunu ve embriyojenik kallus üretimini önemli ölçüde etkileyerek bitki rejenerasyon protokollerinin verimliliğini artırma potansiyelini ortaya koymuştur. Ayrıca, 2,4-D ve Pikloram gibi spesifik BGD lerin çeşitli konsantrasyonlarda kullanılması kallus gelişimini olumlu yönde manipüle etmede etkili olmuş ve kallus üretimi, boyutu ve ağırlığında kayda değer farklılıklar oluşturmuştur. Bu bulgular toplu olarak; embriyogenesisi teşvik etmek ve bitki rejenerasyonunu geliştirmek için genotip ve eksplant faktörlerinin yanı sıra kültür ortamı bileşenlerini optimize etmenin önemini ortaya koymaktadır.

5. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında hem ekmeklik buğday (*T. aestivum*. L) hem de makarnalık bazı buğday (*T. turgidum. desf*) çeşitlerinde, yüksek sayıda haploid ve DH bitkilerin androgenesis yoluyla (mikrospor ve anter kültürü ile) üretilebilmesi için gerekli ortam protokollerinin geliştirilmesi ve aynı zamanda skutellum ve yaprak segmentleri kullanılarak yüksek verimlilikte somatik bitkilerin elde edilebileceği etkili somatik embriyogenesis protokollerinin oluşturulması amaçlanmıştır. Gerçekleştirilen kapsamlı androgenesis çalışmaları anter kültüründe yapılan ön denemelerle başlamış olup, bunlar 1.grup androgenesis denemeleri olarak kabul edilmiştir. Daha sonra 2 yıl boyunca devam eden androgenesis çalışmaları kapsamında 2. ve 3. grup androgenesis denemeleri gerçekleştirilmiş, bu grupların her birisinde hem anter hem de mikrospor kültür denemeleri kurulmuştur. Somatik embriyogenesis çalışmalarında skutellum ve yaprak eksplantlarının kültürü için 4 ana grup indüksiyon ortam grubu oluşturulmuştur. Bu grupları birbirinden ayıran temel özellik, özellikle indüksiyon ortamlarının temel besin ortamları ve karbonhidrat kaynaklarının farklı olmasıdır. Tez çalışmasında kurulan tüm denemelere ait genel sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

- Androgenesis çalışmalarının anter kültürleri arasında 1.grupta yapılan anter kültürlerinde kışlık buğday genotipi olan Altındane genotipi 100 anter başına 46.6 embriyoid, 8 albino bitki ve 0.88 yeşil bitki üretimi ile diğer genotiplere göre en yüksek performansı sergilemiştir, ki bu sonuç buğday anter kültüründe genotipe bağımlılığı ortaya koymuştur. Ortam olarak 2mg /L 2,4-D ve 2mg/L Kinetin katkılı CHB-3 ortamı (3. ortam) 100 anter başına 74.07 embriyoid, 8.15 albino bitki ve 1.45 yeşil bitki üretimini sağlamıştır.
- Mikrospor kültürlerinde II. grup denemelerin 3. ortamında (2 mg /L 2,4-D ve 2 mg/L Kinetin + 500 mg/L Glutamin+ 10 mg/L Arabinogalaktan +100 mg/L Timentin+20 µm/ml aktif karbon katkılı) kültüre alınan Ceyhan-99 genotipi 29.25/petri başına embriyoid üreterek ortam x genotip interaksiyonunun etkisini ortaya koymuştur.
- Genel olarak androgenesis çalışmalarında toplam 1.539 embriyoid, 36 albino bitki, 2 yeşil bitki ve 3 yeşil sürgün elde edilmiştir. Bunlardan 125 embriyoid, 21 albino bitki ve 2 yeşil bitki I. gruptaki anter kültürlerinden, 69 embriyoid ve 12 albino bitki II. gruptaki anter kültürlerinden, 344 embriyoid II. gruptaki

mikrospor kültürlerinden, 300 embriyoid ve 1 albino bitki III. gruptaki anter kültürlerinden ve son olarak 701 embriyoid, 2 albino bitki ve 3 yeşil sürgün ise III. gruptaki mikrospor kültürlerinden elde edilmiştir.

- Androgenesis çalışmalarında daha yüksek timentin konsantrasyonlarına (150-200 mg/L) sahip ortamların anter kültürlerinde embriyoid üretimini desteklediği ve doza bağlı bir yanıt oluşturduğu ortaya konulmuştur. Yüksek timentin seviyeleri mikrospor kültürlerinde ise Ceyhan-99 genotipinde yeşil sürgünlerin üretilmesine yardımcı olmuş ve belirli buğday genotiplerinde rejenerasyonu artırma potansiyelini göstermiştir.
- Aktif karbonun bazı genotiplerde, özellikle Ceyhan-99 genotipinde, embriyoid üretimine yardımcı olduğu gözlenmiştir.
- Bazı denemelerde kullanılan Previcur'un belirgin bir olumlu etkisi görülmemiştir.
- II.grup androgenesis çalışmalarında pH 6 olan ortamlar pH 6.5 olanlardan daha iyi sonuçlar sergilemiş olup, 6.5 pH lı ortamlardan sadece 13. ortam (6 pH'lı 4. ortam ile aynı içerikte) androgenesise olumlu yanıt vermiştir.
- Somatik embriyogenesis çalışmalarında, ekmeklik buğday genotiplerinden özellikle Ceyhan-99 genotipi incelenen parametrelerde (kallus oluşturma, embriyojenik kallus üretimi, kallus boyutu ve ağırlığı, yeşil nokta üretimi, kallus başına sürgün ve rejenerant bitkiler açısından) makarnalık buğday genotiplerinden daha üstün performans göstermiştir.
- Somatik embriyogenesis çalışmalarındaki en yüksek kallus oluşumu; II. grup denemelerin 2.5 mg/L 2,4-D ve 10 mg/L arabinogalaktan içeren 3. ortamında ve I. grup denemelerin 5 mg/L Pikloram ve 10 mg/L arabinogalaktan içeren 9. ortamından elde edilmiştir. I.grup denemelerin 2.5 mg/L 2,4-D içeren 2. ortamı ise en yüksek embriyojenik kallus üretimini sağlamıştır. Bu bulgular, BGD lerin somatik embriyogenesis üzerindeki etkisini vurgularken, ayrıca ortamlara eklenen arabinogalaktanın somatik embriyogenesis sürecindeki olumlu etkisini ortaya koymuştur. Arabinogalaktan Pikloram ile kombinasyon halinde kullanıldığında; kallus üretimi, embriyojenik kallus üretimi ve rejenerasyon parametrelerinde iyileşme sağladığı gözlenmiştir.

- Eksplant kaynağı yönünden skutellum ve yaprak eksplantlarının somatik embriyogenesis tepkileri arasında belirgin farklılıklar gözlemlenmiştir. Skutellum eksplantları; kallus üretimi, embriyojenik kallus üretimi, kallus boyutu, yeşil nokta oluşumu, kallus başına sürgün ve rejenerant bitki oluşumu açısından yaprak segmentlerine kıyasla daha yüksek tepki göstermiştir. Yaprak parçası eksplantları ise daha ağır kalluslar üretmiştir, bu da *in vitro* sekonder metabolit üretimi gibi uygulamalar için potansiyel olarak yararlı olabilir.
- Eksplant kaynağı yönünden skutellum ve yaprak eksplantlarının somatik embriyogenesis tepkileri arasında belirgin farklılıklar gözlemlenmiştir. Skutellum eksplantları; kallus üretimi, embriyojenik kallus üretimi, kallus boyutu, yeşil nokta oluşumu, kallus başına sürgün ve rejenerant bitki oluşumu açısından yaprak segmentlerine kıyasla daha yüksek tepki göstermiştir. Yaprak parçası eksplantları ise daha ağır kalluslar üretmiştir, bu da *in vitro* sekonder metabolit üretimi gibi uygulamalar için potansiyel olarak yararlı olabilir.
- Rejenerasyon ortamları da somatik embriyogenesis sürecinde önemli bir rol oynamıştır. 1 mg/L BAP, 3 mg/L kinetin, 500 mg/L glutamin içeren ortamlar, yeşil nokta üretimini, kallus başına sürgün ve rejenerant oluşumunu teşvik etmiştir.
- Somatik embriyogenesis çalışmalarından toplam 622 bitki elde edilmiş olup; bunlardan 277 bitki I. grup denemelerden, 183 bitki II. grup denemelerden, 86 III. grup denemelerden ve 76 bitki IV. grup denemelerden üretilmiştir.
- Somatik embriyogenesis çalışmalarında kallusların indüksiyon ortamından rejenerasyon ortamına aktarılmasının genel olarak başarılı bitkicik gelişimi ile sonuçlanmıştır. Çalışmada tipik olarak ‘Loblolly Çamı’ için kullanılan bir besin ortamı olan Westvaco (WV5) ortamının, buğday somatik embriyogenesisinde de kullanım potansiyeli olduğu ortaya çıkmıştır. Söz konusu ortam, kallusların bitkiciğe dönüşümünü destekleyerek buğdayda somatik embriyoların rejenerasyonunda etkinliğini göstermiş ve daha farklı alanlarda da uygulanabilirliğini ortaya koymuştur. Bu bulgu, sadece buğday somatik embriyogenesisi anlayışımızı geliştirmekle kalmamış, aynı zamanda WV5 ortamının çeşitli bitki türlerinin rejenerasyon süreçlerinde kullanılması için de yeni bir potansiyel sunmuştur.

6. KAYNAKLAR

- Aadel, H., Ahansal, K., Udupa, S. M., Gaboun, F., Abdelwahd, R., Douira, A., Iraqi, D. 2016b. "Effect of genotypes and culture media on embryogenic callus induction and plantlet regeneration from mature and immature bread wheat embryos". Romanian Agricultural Research, 2016(33).
- Adero, M. O., Syombua, E. D., Kwamboka Asande, L., Amugune, N. O., Mulanda, E. S., Macharia, G. 2019. "Somatic embryogenesis and regeneration of Kenyan wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes from mature embryo explants". African Journal of Biotechnology, 18(27), 689-694.
- Ahmadpour, R., Zare, N., Asghari-Zakarta, R., Sheikhzadeh, P. 2017a. "Efficient in vitro somatic embryogenesis and plant regeneration from mature and immature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.)". Brazilian Archives of Biology and Technology, 60(December), 1-12.
- Ahuja, P., Pental, D., Cocking, E. 1982. "Plant regeneration from leaf base callus and cell suspensions of *Triticum aestivum*".
- Ari, E. 2006. "Türkiyede doğal olarak yetişen *Anemone coronaria* var. *coccineada* anter kültürü çalışmaları".
- Armstrong, T. A., Metz, S. G., Mascia, P. N. 1987. "TWO REGENERATION SYSTEMS FOR THE PRODUCTION OF HAPLOID PLANTS FROM W H E A T ANTHER CULTURE". Plant Science, 51, 231-237.
- Asif, M., Eudes, F., Goyal, A., Amundsen, E., Randhawa, H., Spaner, D. 2013. "Organelle antioxidants improve microspore embryogenesis in wheat and triticale". In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 49(5), 489-497.
- Asif, M., Eudes, F., Randhawa, H., Amundsen, E., Spaner, D. 2014. "Phytosulfokine alpha enhances microspore embryogenesis in both triticale and wheat". Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 116(1), 125-130.
- Asif, M., Eudes, F., Randhawa, H., Amundsen, E., Yanke, J., Spaner, D. 2013. "Cefotaxime prevents microbial contamination and improves microspore embryogenesis in wheat and triticale". Plant Cell Reports, 32(10), 1637-1646.
- Avni, R., Nave, M., Eilam, T., Sela, H., Alekperov, C., Peleg, Z., ... Distelfeld, A. 2014. "Ultra-dense genetic map of durum wheat × wild emmer wheat developed using the 90K iSelect SNP genotyping assay". Molecular Breeding, 34(4), 1549-1562.

- Aydin, M., Hossein Pour, A., Haliloğlu, K., Tosun, M. 2016. "Effect of polyamines on somatic embryogenesis via mature embryo in wheat". *Turkish Journal of Biology*, 40, 1178-1184.
- Ayed Slama, O., Slim Amara, H. 2021. "Unpollinated Ovaries Used to Produce Doubled Haploid Lines in Durum Wheat". *Methods in Molecular Biology*, 2287, 245-255.
- Bajaj, Y. P. S. (Ed.). 1990. "Wheat" (1. bs, C. 13). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Bannikova, M. A., Gorbatyuk, I. R., Hnatiuk, I. S., Malysheva-Otto, L. V, Duplij, V. P. 2016. "Effect of Ceftriaxone and Timentin antibiotics on morphogenesis in the in vitro culture of bread wheat *Triticum aestivum* L". *Biopolymers and Cell*, 32(5), 367-376.
- Barclay, I. R. 1975. "High frequencies of haploid production in wheat (*Triticum aestivum*) by chromosome elimination". *Nature*, 256(5516), 410-411.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., ... Horvath, P. 2007. "CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes". *Science*, 315(5819), 1709-1712.
- Benkirane, H., Sabounji, K., Chlyah, A., Chlyah, H. 2000. "Somatic embryogenesis and plant regeneration from fragments of immature inflorescences and coleoptiles of durum wheat". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 61(2), 107-113.
- Bie, X. M., Dong, L., Li, X. H., Wang, H., Gao, X. Q., Li, X. G. 2020. "Trichostatin A and sodium butyrate promotes plant regeneration in common wheat". *Plant Signal Behav*, 15(12), 1820681.
- Bortesi, L., Fischer, R. 2015. "The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond". *Biotechnology advances*, 33(1), 41-52.
- Broughton, S. 2011. "The application of n-butanol improves embryo and green plant production in anther culture of Australian wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes". *Crop and Pasture Science*, 62(10), 813-822.
- Broughton, S., Castello, M., Liu, L., Killen, J., Hepworth, A., O'Leary, R. 2020. "The effect of caffeine and trifluralin on chromosome doubling in wheat anther culture". *Plants*, 9(1).
- Cai, Q., Szarejko, I., Polok, K., Maluszynski, M. 1992. "The effect of sugars and growth regulators on embryoid formation and plant regeneration from barley anther culture". *Plant Breed*, 109(3), 218-226.

- Castillo, A M, Valero-Rubira, I., Burrell, M. A., Allue, S., Costar, M. A., Valles, M. P. 2020. "Trichostatin A Affects Developmental Reprogramming of Bread Wheat Microspores towards an Embryogenic Route". *Plants (Basel)*, 9(11).
- Castillo, Ana M., Sánchez-Díaz, R. A., Vallés, M. P. 2015. "Effect of ovary induction on bread wheat anther culture: Ovary genotype and developmental stage, and candidate gene association". *Frontiers in Plant Science*, 6(JUNE), 1-12.
- Chu, C. C., Hill, R. D., Brule-Babel, L. 1990. "High frequency of pollen embryoid formation and plant regeneration in *Triticum aestivum* L. on monosaccharide containing media". *Plant Science*, 66(2), 255-262.
- Ouyang, T. W., Hu, H., Chuang, C. C., & Tseng, C. C. (1973). Induction of pollen plants from anthers of *Triticum aestivum* L. cultured in vitro
- Chugh, A., Khurana, P. 2003. "Regeneration via somatic embryogenesis from leaf basal segments and genetic transformation of bread and emmer wheat by particle bombardment". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74, 151-161.
- Cistué, L., Soriano, M., Castillo, A. M., Vallés, M. P., Sanz, J. M., Echávarri, B. 2006. "Production of doubled haploids in durum wheat (*Triticum turgidum* L.) through isolated microspore culture". *Plant Cell Reports*, 25(4), 257-264.
- Datta, S. K., Wenzel, G. 1987. "Isolated microspore derived plant formation via embryogenesis in *Triticum aestivum* L.". *Plant Science*, 48(1), 49-54.
- de Buyser, J., Henry, Y., Lonnet, P., Hertzog, R., Hespel, A. 1987. "‘Florin’: A Doubled Haploid Wheat Variety Developed by the Anther Culture Method". *Plant Breeding*, 98(1), 53-56.
- Delporte, F., Mostade, O., Jacquemin, J. M. 2001. "Plant regeneration through callus initiation from thin mature embryo fragments of wheat". *Plant cell, tissue and organ culture*, 67, 73-80.
- Dudits, D., Nemet, G., Haydu, Z. 1975. " Study of callus growth and organ formation in wheat (*Triticum aestivum*) tissue cultures ". *Canadian Journal of Botany*, 53(10), 957-963.
- Due Tuveesson, I. K., Viktoria Öhlund, R. C. 1993. "Plant regeneration through culture of isolated microspores of *Triticum aestivum* L.". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 34(2), 163-167.
- Dunwell, J. M. 2010. "Haploids in flowering plants: Origins and exploitation". *Plant Biotechnology Journal*, 8(4), 377-424.

- Echávarri, B., Cistué, L. 2016. "Enhancement in androgenesis efficiency in barley (*Hordeum vulgare* L.) and bread wheat (*Triticum aestivum* L.) by the addition of dimethyl sulfoxide to the mannitol pretreatment medium". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 125(1), 11-22.
- El-Hennawy, M. A., Abdalla, A. F., Shafey, S. A., Al-Ashkar, I. M. 2011. "Production of doubled haploid wheat lines (*Triticum aestivum* L.) using anther culture technique". *Annals of Agricultural Sciences*, 56(2), 63-72.
- Eliby, S., Bekkuzhina, S., Kishchenko, O., Iskakova, G., Kylyshbayeva, G., Jatayev, S., ... Shavrukov, Y. 2022. "Developments and prospects for doubled haploid wheat". *Biotechnology Advances*, 60.
- Fahmy, A. H., El-Shafy, Y. H., El-Shihy, O. M., Madkour, M. 2006. "Highly efficient regeneration system via somatic embryogenesis from immature embryos of Egyptian wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) using different growth regulators". *World J. Agr. Sci*, 22(May 2014), 82-289.
- FAO. 2023. "Prospects and Food Situation – Triannual Global Report". Rome, Italy. 24 May. Available at: <https://doi.org/10.4060/cc8566en>
- FAOSTAT. 2023. "GIEWS - Global Information and Early Warning System". 24 May. Available at: <http://www.faostat.fao.org/>
- Fidan, H., Calis, O., Ari, E., Atasayar, A., Sarikaya, P., Tek, M. I., ... Firat, G. 2023. "Knockout of *elf4E* using CRISPR/Cas9 for large-scale production of resistant cucumber cultivar against WMV, ZYMV, and PRSV". *Frontiers in Plant Science*, 14, 1143813.
- Filippov, M., Miroshnichenko, D., Vernikovskaya, D., Dolgov, S. 2006. "The effect of auxins, time exposure to auxin and genotypes on somatic embryogenesis from mature embryos of wheat". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 84(2), 213-222.
- Filippov, M., Miroshnichenko, D., Vernikovskaya, D., Dolgov, S. 2006c. "The effect of auxins, time exposure to auxin and genotypes on somatic embryogenesis from mature embryos of wheat". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 84(2), 213-222.
- Gaines, E. F., Aase, H. C. 1926. "A Haploid Wheat Plant". *American Journal of Botany*, 13(6), 373.
- Gamborg, O. L., Miller, R. A., Ojima, K. 1968. "Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells". *Experimental Cell Research*, 50(1), 151-158.
- Ghaemi, M., Sarrafi, A., Alibert, G. 1992. "Influence of genotype and culture conditions on the production of embryos from anthers of tetraploid wheat (*Triticum turgidum*)". *Euphytica*, 65(2), 81-85.

- Gomez-Pando, L. R., Jimenez-Davalos, J., Eguiluz- De La Barra, A., Aguilar-Castellanos, E., Falconí-Palomino, J., Ibañez-Tremolada, M., ... Lorenzo, J. C. 2009. "Field performance of new in vitro androgenesis-derived double haploids of barley". *Euphytica*, 166(2), 269-276.
- Gowda, A. K., Mishra, S. B., Barman, M., Saikumar, M. 2020. "CRISPR/Cas9: A Revolutionary Tool for Recent Advances in Crop Improvement: A Review". *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 9(11), 200-214.
- Gustafson, V. D., Baenziger, P. S., Wright, M. S., Stroup, W. W., Yen, Y. 1995. "Isolated wheat microspore culture". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 42(2), 207-213.
- Hansen, N. J. P., Andersen, S. B. 1998. "In vitro chromosome doubling with colchicine during microspore culture in wheat (*Triticum aestivum* L.)". *Euphytica*, 102(1), 101-108.
- He, G. Y., Lazzeri, P. A. 2001. "Improvement of somatic embryogenesis and plant regeneration from durum wheat (*Triticum turgidum* var. durum Desf.) scutellum and inflorescence cultures". *Euphytica*, 119, 369-376.
- Holme, I. B., Olesen, A., Hansen, N. J. P., Andersen, S. B. 1999. "Anther and isolated microspore culture response of wheat lines from northwestern and eastern Europe". *Plant Breeding*, 118(2), 111-117.
- Hunter, C. Paul. 1988. "Plant regeneration from microspores of barley *Hordeum vulgare* L ". Doctoral dissertation, Imperial College London (University of London), London.
- Ishaque, W., Osman, R., Hafiza, B. S., Malghani, S., Zhao, B., Xu, M., Ata-Ul-Karim, S. T. 2023. "Quantifying the impacts of climate change on wheat phenology, yield, and evapotranspiration under irrigated and rainfed conditions". *Agricultural Water Management*, 275.
- Islam, S. M. S. 2010. "The effect of colchicine pretreatment on isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.)". *Australian Journal of Crop Science*, 4(9), 660-665.
- JE Coke - US Patent 5, 534,433, 1996, undefined. 1995. "Basal nutrient medium for in vitro cultures of Loblolly pines". Google Patents. Geliş tarihi gönderen <https://patents.google.com/patent/US5534433A/en>
- Jiang, F., Ryabova, D., Diedhiou, J., Hucl, P., Randhawa, H., Marillia, E. F., ... Kathiria, P. 2017. "Trichostatin A increases embryo and green plant regeneration in wheat". *Plant Cell Reports*, 36(11), 1701-1706.

- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., Charpentier, E. 2012. "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity". *Science*, 337(6096), 816-821.
- Joshi, R. K., Bharat, S. S., Mishra, R. 2020. "Engineering drought tolerance in plants through CRISPR/Cas genome editing". *3 Biotech*, 10(9), 1-14.
- Kanbar, O., Lantos, C., Kiss, E., Pauk, J. 2020. "Androgenic responses of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) combinations in in vitro anther culture". *Genetika*, 52(1), 335-350.
- Kavas, M., Öktem, H. A., Yücel, M. 2008a. "Factors affecting plant regeneration from immature inflorescence of two winter wheat cultivars". *Biologia plantarum*, 52, 621-626.
- Khiabani, B. N., Vedadi, C., Rahmani, E., Shalmani, M. A. M. 2008. "Response of some Iranian wheat genotypes to anther culture system". *Indian Journal of Biotechnology*, 7(4), 531-535.
- Kim, K. M., Baenziger, P. S. 2005. "A simple wheat haploid and doubled haploid production system using anther culture". *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 41(1), 22-27.
- Kopertekh, L. G., Stribnaya, L. A. 2003a. "Plant regeneration from wheat leaf explants". *Russian journal of plant physiology*, 50, 365-369.
- Kumari, M., Clarke, H. J., Small, I., Siddique, K. H. M. 2009. "Albinism in plants: A major bottleneck in wide hybridization, androgenesis and doubled haploid culture". *Critical Reviews in Plant Sciences*, 28(6), 393-409.
- Labani, Z., Buyser, J. De, Breeding, E. P.-P., 2007, undefined. 2007. "Effect of mannitol pretreatment to improve green plant regeneration on isolated microspore culture in *Triticum turgidum* ssp. *durum* cv. "Jennah Khetifa"". Wiley Online.
- Lantos, C., Weyen, J., Orsini, J. M., Gnad, H., Schlieter, B., Lein, V., ... Pauk, J. 2013. "Efficient application of in vitro anther culture for different European winter wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding programmes". *Plant Breeding*, 132(2), 149-154.
- le Roux, M. L., Botha, A. M., van der Vyver, C. 2016a. "Somatic embryogenesis and cryopreservation of South African bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes". *South African Journal of Botany*, 106, 78-88.
- Letarte, J., Simion, E., Miner, M., Kasha, K. J. 2006. "Arabinogalactans and arabinogalactan-proteins induce embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore culture". *Plant Cell Reports*, 24(12), 691-698.

- Levy, A. A., Feldman, M. 2022. "Evolution and origin of bread wheat". *Plant Cell*, 34(7), 2549-2567.
- Li, B., Caswell, K., Leung, N., Chibbar, R. N. 2003. "Wheat (*Triticum aestivum* L.) somatic embryogenesis from isolated scutellum: Days post anthesis, days of spike storage, and sucrose concentration affect efficiency". *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 39(1), 20-23.
- M. Maluszynski, Kasha, K. J., Forster, B. P., Szarejko, I. 2003. "Doubled Haploid Production in Crop Plants". (M. Maluszynski, K. J. Kasha, B. P. Forster, & I. Szarejko, Ed.). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Magnusson, I., Bornman, C. H. 1985. "Anatomical observations on somatic embryogenesis from scutellar tissues of immature zygotic embryos of *Triticum aestivum*". *Physiologia Plantarum*, 63(2), 137-145.
- MAHALAKSHMI, A., P. KHURANA, J., KHURANA, P. 2003. "Rapid Induction of Somatic Embryogenesis by 2,4-D in Leaf Base Cultures of Wheat (*Triticum aestivum* L.)". *Plant Biotechnology*, 20(4), 267-273.
- Mahalakshmi, A., Singla, B., Khurana, J. P., Khurana, P. 2007. "Role of calcium-calmodulin in auxin-induced somatic embryogenesis in leaf base cultures of wheat (*Triticum aestivum* var. HD 2329)". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 88(2), 167-174.
- Malik, K., Birla, D., Yadav, H., Sainger, M., Chaudhary, D., Jaiwal, P. K. 2017. "Evaluation of carbon sources, gelling agents, growth hormones and additives for efficient callus induction and plant regeneration in Indian wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes using mature embryos". *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 20(3), 185-192.
- Mao, Y., Botella, J. R., Liu, Y., Zhu, J. K. 2019. "Gene editing in plants: Progress and challenges". *National Science Review*, 6(3), 421-437.
- Masojc, P., Lukow, O. M., McKenzie, R. I. H., Howes, N. K. 1993. " Responsiveness to anther culture in cultivars and F 1 crosses of spring wheat ". *Canadian Journal of Plant Science*, 73(3), 777-783.
- Mejza, S. J., Morgant, V., DiBona, D. E., Wong, J. R. 1993. "Plant regeneration from isolated microspores of *Triticum aestivum*". *Plant Cell Reports*, 12(3), 149-153.
- Menke-Milczarek, I., Zimny, J. 2001. "NH₄⁺ and NO₃⁻ requirement for wheat somatic embryogenesis". *Acta Physiologiae Plantarum*, 23(1), 37-42.
- Mujib, A., Šamaj, J. 2006. "Somatic embryogenesis" (C. 2). Springer Science & Business Media.

- Murashige, T., Skoog, F. 1962. "A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures". *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
- Navarro-Alvarez, W. 1992. "IMPROVEMENT OF WHEAT (*Triticum aestivum* L.) ANTHHER CULTURE METHODS FOR DOUBLED HAPLOID PLANT PRODUCTION". Geliş tarihi gönderen <https://digitalcommons.unl.edu/dissertations/AAI9308190>
- Neuhaus, G., Spangenberg, G., Mittelsten Scheid, O., Schweiger, H. G. 1987. "Transgenic rapeseed plants obtained by the microinjection of DNA into microspore-derived embryoids". *Theoretical And Applied Genetics*, 75(1), 30-36.
- Nitsch, C. 1973. "Effect d'un choc thermique sur le pouboir embryogene du pollen de *Datura innoxia* cultive dans l'anthere ou isole de l'anthere". *CR Acad. Sci.*, 276, 303-306. Geliş tarihi gönderen <https://cir.nii.ac.jp/crid/1570854174459928320>
- Ozias-Akins, P., Vasil, I. K. 1983. "Callus induction and growth from the mature embryo of *Triticum aestivum* (Wheat)". *Protoplasma*, 115(2-3), 104-113.
- Pan, M. J., Van Staden, J. 1998. "The use of charcoal in in vitro culture-A review". *Plant Growth Regulation* (C. 26).
- Parmar, Sanjay Singh, Sainger, M., Chaudhary, D., Jaiwal, P. K. 2012. "Plant regeneration from mature embryo of commercial Indian bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars". *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 18(2), 177-183.
- Patial, M., Pal, D., Thakur, A., Bana, R. S., Patial, S. 2017. "Doubled Haploidy Techniques in Wheat (*Triticum aestivum* L.): An Overview". *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 89(1), 27-41.
- Peleg, Z., Cakmak, I., Ozturk, L., Yazici, A., Jun, Y., Budak, H., ... Saranga, Y. 2009. "Quantitative trait loci conferring grain mineral nutrient concentrations in durum wheat× wild emmer wheat RIL population". *Theoretical and applied genetics*, 119, 353-369.
- P.Lashermes. 1992. "Improved anther culture method for obtaining direct regenerationin wheat (*Triticumaestivum* L.)". *Journal of Genetics and Breeding*, 46(1), 99-102.
- Potrykus, I. 2007. "Direct Gene Transfer to Plants", 144-162.
- Pourali Kahriz, P., Pourali Kahriz, M. 2017. "Somatic Embryogenesis on Plumule and Radicle Explants Obtained from Warm Water Hydroprimed Wheat (*Triticum aestivum* L.) cv. Kunduru and cv. Cakmak Seeds". *Sains Malaysiana*, 46(1), 35-41.

- Purnhauser, L., Medgyesy, P., Czakó, M., Dix, P. J., Márton, L. 1987. "Stimulation of shoot regeneration in *Triticum aestivum* and *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. tissue cultures using the ethylene inhibitor AgNO₃". *Plant Cell Reports*, 6(1), 1-4.
- Ramírez-Mosqueda, M. A. 2022. "Overview of Somatic Embryogenesis". *İçinde Methods in Molecular Biology* (C. 2527, ss. 1-8).
- Richa, U. 2022. "Anther culture for haploid plant production". *Advances in Plant Tissue Culture: Current Developments and Future Trends*, 157-174.
- Saha, S., Islam, Z., Islam, S., Hassan, M. F., Hossain, Md. S., Islam, S. M. S. 2017. "Enhancement of Somatic Embryogenesis by Mature and Immature Seeds in Wheat (*Triticum aestivum* L.)". *Journal of Biology and Life Science*, 8(2), 20.
- Satpathy, P., Fuente, S. A. de la, Ott, V., Müller, A., Buüchner, H., Daghma, D. E. S., Kumlehn, J. 2021. "Generation of DoubledHaploid Barley by InterspecificPollination with *Hordeum bulbosum*". *İçinde Jose M Segui-Simarro (Ed.), Doubled Haploid Technology* (C. 1, ss. 215–226). Humana, New York, NY.
- Schaeffer, G. W., Baenziger, P. S., Worley, J. 1979. "Haploid Plant Development from Anthers and In Vitro Embryo Culture of Wheat". *Crop Science*, 19(5), 697-702.
- Segui-Simarro, J M, Nuez, F. 2008. "How microspores transform into haploid embryos: changes associated with embryogenesis induction and microspore-derived embryogenesis". *Physiol Plant*, 134(1), 1-12.
- Sharafat, A. R., Ari, E., Izmirlı, A. 2023. "The Effect of Dimethyl Sulfoxide on Embryogenesis and Green Plant Regeneration in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Anther Culture". *Biology and Life Sciences Forum 2023*, Vol. 27, Page 46, 27(1), 46.
- Sibi, M. L., Kobaissi, A., Shekafandeh, A. 2001. "Green haploid plants from unpollinated ovary culture in tetraploid wheat (*Triticum durum* Defs.)". *Euphytica*, 122(2), 351-359.
- Sinha, Rakesh K., Pospíšil, P., Maheshwari, P., Eudes, F. 2016. "Bcl-2Δ21 and Ac-DEVD-CHO inhibit death of wheat microspores". *Frontiers in Plant Science*.
- Sinha, Rakesh Kumar, Eudes, F. 2015. "Dimethyl tyrosine conjugated peptide prevents oxidative damage and death of triticale and wheat microspores". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 122(1), 227-237.
- Slama-Ayed, O., Bouhaouel, I., Ayed, S., Buyser, J. De, Picard, E., Amara, H. S. 2019. "Efficiency of three haplomethods in durum wheat (*Triticum turgidum* subsp. durum def.): Isolated microspore culture, gynogenesis and wheat × maize crosses". *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 55(3), 101-109.

- Soriano, M., Cistué, L., Castillo, A. M. 2008. "Enhanced induction of microspore embryogenesis after n-butanol treatment in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture". *Plant Cell Reports*, 27(5), 805-811.
- Soriano, Mercedes, Cistué, L., Vallés, M. P., Castillo, A. M. 2007. "Effects of colchicine on anther and microspore culture of bread wheat (*Triticum aestivum* L.)". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 91(3), 225-234.
- Sunderland, N., Roberts, M. 1977. "New approach to pollen culture". *Nature*, 270(5634), 236-238.
- Tadesse, W., Tawkaz, S., Inagaki, M. N., Picard, E., Baum, M. 2013. "Methods and Applications of Doubled Haploid Technology in Wheat Breeding. A Technical Manual". *Tools & Guidelines*, 36.
- Takumi, S., Shimada, T. 1997. "Variation in transformation frequencies among six common wheat cultivars through particle bombardment of scutellar tissues". *Genes & genetic systems*, 72(2), 63-69.
- Thomas, E., King, P. J., Potrykus, I. 1977. "Shoot and embryo-like structure formation from cultured tissues of *Sorghum bicolor*". *Naturwissenschaften*, 64(11), 587.
- Tinak Ekom, D., Udupa, S., Gaboun, F., Benchekroun, M., Ennaji, M., Iraqi, D. 2013. "Efficient callus induction and plantlets regeneration in durum wheat using mature embryos". *Cereal Research Communications*, 41(2), 266-274.
- Touraev, A., Indrianto, A., Wratschko, I., Vicente, O., Heberle-Bors, E. 1996. "Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high temperature". *Sexual Plant Reproduction*, 9(4), 209-215.
- Touraev, Alisher, Vicente, O., Heberle-Bors, E. 1997. "Initiation of microspore embryogenesis by stress". *Trends in Plant Science*, 2(8), 297-302.
- Trottier, M. C., Collin, J., Comeau, A. 1993. "Comparison of media for their aptitude in wheat anther culture". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 35(1), 59-67.
- TSI. 2023. "Crop Production Statistics, 2023". 24 May .Available at: <https://data.tuik.gov.tr/>
- USDA. 2024. "Wheat Explorer", 15 June. Available at: https://ipad.fas.usda.gov/cropexplorer/cropview/commodityView.aspx?startrow=11&cropid=0410000&sel_year=2021&rankby=Production
- Vasil, V., Vasil, I. K. 1981. "SOMATIC EMBRYOGENESIS AND PLANT REGENERATION FROM TISSUE CULTURES OF *Pennisetum*

- AMERICANUM, AND P. AMERICANUM x P. PURPUREUM HYBRID". American Journal of Botany, 68(6), 864-872.
- Vural, Gulsun Elif, Ari, E. 2020. "Triple synergistic effect of maltose, silver nitrate and activated charcoal on high embryo yield of eggplant (*Solanum melongena* L.) anther cultures". Scientia Horticulturae, 272, 109472.
- Vural, Gülsün Elif, Ari, E., Zengin, S., Ellialtioglu, S. S. 2019. "Development of androgenesis studies on eggplant (*Solanum melongena* L.) in Turkey from past to present". Sustainable Crop Production.
- Wang, H. M., Enns, J. L., Nelson, K. L., Brost, J. M., Orr, T. D., Ferrie, A. M. R. 2019. "Improving the efficiency of wheat microspore culture methodology: evaluation of pretreatments, gradients, and epigenetic chemicals". Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 139(3), 589-599.
- Wei, Z. M. 1982. "Pollen callus culture in *Triticum aestivum*". Theoretical and Applied Genetics, 63(1), 71-73.
- Weigt, D., Niemann, J., Siatkowski, I., Zyprych-Walczak, J., Olejnik, P., Kurasiak-Popowska, D. 2019. "Effect of zearalenone and hormone regulators on microspore embryogenesis in anther culture of wheat". Plants, 8(11).
- Weigt, D., Siatkowski, I., Magaj, M., Tomkowiak, A., Nawracala, J. 2020. "Impact of ionic liquids on induction of wheat microspore embryogenesis and plant regeneration". Agronomy, 10(6).
- Wernicke, W., Milkovits, L. 1987. "Rates of uptake and metabolism of indole-3-acetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by cultured leaf segments at different stages of development in wheat". Physiologia Plantarum, 69(1), 23-28.
- Wheatley, W. G., Marsolais, A. A., Kasha, K. J. 1986. "Microspore growth and anther staging in barley anther culture". Plant Cell Reports, 5(1), 47-49.
- Yadav, H., Malik, K., Kumar, S., Jaiwal, P. K. 2020. "Comparative regeneration in six bread wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties from immature and mature scutella for developing efficient and genotype-independent protocol prerequisite for genetic improvement of wheat". In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 56, 610-617.
- Yaniv, E., Raats, D., Ronin, Y., Korol, A. B., Grama, A., Bariana, H., ... Fahima, T. 2015. "Evaluation of marker-assisted selection for the stripe rust resistance gene Yr15, introgressed from wild emmer wheat". Molecular breeding, 35, 1-12.

- Yu, H., Wang, W., Wang, Y., Hou, B. 2012. "High frequency wheat regeneration from leaf tissue explants of regenerated plantlets". *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 03(01), 46-50.
- Zambriborshch, I., Shestopal, O., Traskovetskaya, V., Vasiliev, O., Halaiev, O., Halaieva, M., ... Chekalova, M. 2023. "Obtaining dihaploid lines of winter bread wheat with complex resistance to rust and common bunt by anther culture in vitro". *Cereal Research Communications*, (0123456789).
- Zhang, J., Friebe, B., Raupp, W. J., Gill, B. S. 1996. "Wheat embryogenesis and haploid production in wheat $\times$ maize hybrids". *Euphytica*, 90, 315–324.
- Zhang, W., Wang, X., Fan, R., Yin, G., Wang, K., Du, L., ... Ye, X. 2015a. "Effects of inter-culture, arabinogalactan proteins, and hydrogen peroxide on the plant regeneration of wheat immature embryos". *Journal of Integrative Agriculture*, 14(1), 11-19.
- Zhang, W., Wang, X., Fan, R., Yin, G., Wang, K., Du, L., ... Ye, X. 2015b. "Effects of inter-culture, arabinogalactan proteins, and hydrogen peroxide on the plant regeneration of wheat immature embryos". *Journal of Integrative Agriculture*, 14(1), 11-19.
- Zhao, C., Liu, B., Piao, S., Wang, X., Lobell, D. B., Huang, Y., ... Asseng, S. 2017. "Temperature increase reduces global yields of major crops in four independent estimates". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(35), 9326-9331.
- Zheng, M. Y., Liu, W., Weng, Y., Polle, E., Konzak, C. F. 2001. "Culture of freshly isolated wheat (*Triticum aestivum* L.) microspores treated with inducer chemicals". *Plant Cell Reports*, 20(8), 685-690.
- Zheng, M. Y., Weng, Y., Liu, W., Konzak, C. F. 2002. "The effect of ovary-conditioned medium on microspore embryogenesis in common wheat (*Triticum aestivum* L.)". *Plant Cell Reports*, 20(9), 802-807.
- Zheng, M. Y., Weng, Y., Sahibzada, R., Konzak, C. F. 2003. "Isolated microspore culture in maize (*Zea mays* L.), production of doubled-haploids via induced androgenesis". *İçinde Doubled Haploid Production in Crop Plants* (ss. 95-102).
- Zheng, Ming Y. 2003. "Microspore culture in wheat (*Triticum aestivum*) - Doubled haploid production via induced embryogenesis". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 73(3), 213-230.
- Zhih-ching, C., Chin-chü, W., Chin-san, S., Nan-fan, C., Kwang-chu, Y., Chen, H. 1973. "Investigations on the Induction and Morphogenesis of Wheat (*Triticum vulgare*) Pollen Plants". *Journal of Integrative Plant Biology*, 15(1).

Ziauddin, A., Simion, E., Kasha, K. J. 1990. "Improved plant regeneration from shed microspore culture in barley (*Hordeum vulgare* L.) cv. igri". Plant Cell Reports, 9(2), 69-72.



ÖZGEÇMİŞ

Ahmad Ratib SHARAFAT

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Doktora	Akdeniz Üniversitesi
2018-2024	Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Antalya
Yüksek Lisans	Kazakh National Agrarian Üniversitesi
2014-2017	Teknoloji ve Biyokaynaklar fakültesi, Bitki Biyomühendisliği Bölümü, Almaty, Kazakhstan
Lisans	Nangarhar Üniversitesi
2008-2012	Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkiler Bölümü, Nangarhar, Afghanistan

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Öğretim Üyesi	Seyyid Cemaleddin Afgani Üniversitesi
2017-Devam Ediyor	Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkiler Bölümü, Kunar
Öğretim Görevlisi	Seyyid Cemaleddin Afgani Üniversitesi
2013-2017	Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkiler Bölümü, Kunar

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1- Sharafat, A. R., Ari, E., Izmirli, A. 2023. "The Effect of Dimethyl Sulfoxide on Embryogenesis and Green Plant Regeneration in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Anther Culture". Biology and Life Sciences Forum 2023, Vol. 27, Page 46, 27(1), 46.