ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gülsüm SAVCI

NOHUT ANTER KÜLTÜRÜNDE GENOTİP VE BÜYÜME DÜZENLEYİCİLERİNİN HAPLOİD BİTKİ REJENERASYONUNA ETKİLERİ

TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

ADANA-2021

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NOHUT ANTER KÜLTÜRÜNDE GENOTİP VE BÜYÜME DÜZENLEYİCİLERİNİN HAPLOİD BİTKİ REJENERASYONUNA ETKİLERİ

Gülsüm SAVCI

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU
Yıl: 2021, Sayfa: 81
Jüri : Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU
: Prof. Dr.Hakan ÖZKAN
: Prof. Dr.Nafiz ÇELİKTAŞ

Nohut anter kültüründe oksin çeşidi (2,4-D ve Picloram) ve konsantrasyonu (5 mg/l, 10 mg/l; 1 mg/l, 2 mg/l) ile sitokinin çeşidi (BAP ve Kin) ve konsantrasyonunun (0 mg/l, 0.5 mg/l) farklı nohut genotiplerinde haploid bitki oluşumuna etkisini saptamak amacıyla yürütülen bu araştırmada; Seçkin, İnci, Onur, Sezgin ve Hasanbey genotipleri test edilmiştir.

Varyans analizi sonuçları, genotip, oksin çeşidi, sitokinin çeşidi ve sitokinin konsantrasyonu ile bu faktörlerin interaksiyonlarının kallus ve/veya embriyo oluşturan anter oranını önemli derecede etkilediğini göstermiştir. Anter reaksiyon oranı; genotiplere bağlı olarak % 3.3-7.9 arasında değişmiş, 2,4-D oksininin Piclorama göre, Kinetin sitokininin de BAP'a göre anter reaksiyon oranı açısından daha etkili olduğu saptanmıştır. Anterlerden oluşan kallus ve embriyolar rejenerasyon ortamına aktarıldığında kök rejenerasyonu gerçekleşmiş, ancak bitki rejenerasyonu gerçekleşmemiştir. Araştırmadan elde edilen bulgulara dayanılarak, ülkemizdeki nohut genotiplerinin anter kültürüne reaksiyonlarının, uygun besi ortamı ve kültür öncesi anterlere stres uygulama yönteminin optimize edilmesine yönelik araştırmalarının yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Nohut, Genotip, Anter Kültürü, oksin, sitokinin, konsantrasyon

ABSTRACT

MSc. THESIS

EFFECTS OF GENOTYPE AND PLANT GROWTH REGULATORS ON HAPLOID PLANT PRODUCTION FROM ANTHERS OF CHICKPEA

Gülsüm SAVCI

CUKUROVA UNİVERSİTY
INSTITUTE OF SCIENCE SCIENCES
DEPARTMENT OF FIELD CROPS

Supervisor : Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU
Year: 2021, Page:81
Jury : Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU
: Prof. Dr. Hakan ÖZKAN
: Prof. Dr. Nafiz ÇELİKTAŞ

In order to determine the effect of auxin type (2,4-D and Picloram) and concentration (5 mg/l, 10 mg/l;1 mg/l, 2 mg/L) as well as cytokine type (BAP and Kin) and concentration (0 mg/l, 0.5 mg/l) on haploid plant regeneration from the anthers of the different chickpea genotypes, chickpea cultivars Seçkin, İnci, Onur, Sezgin and Hasanbey genotypes were tested.

Results of the variance analyses on the data obtained showed that genotype, auxin type, cytokinin type and concentration as well as their interactions significantly affected the ratio of the anthers forming callus and/or embryo. Ratio of the responding anthers varied between 3.3% and 7.9% depending on the genotype. It was determined that 2,4-D was more efective than Picloram in anther reaction rate. On the other hand, Kinetin resulted in higher anther reaction rate than BAP. When the calli and embryos were transferred into regeneration medium, they regenerated only root but not the plant. From the results of the study, it was concluded that the further research at the aiming to determine response of chickpea genetic resources of Turkey to the anther culture and to optimize the nutrient medium and stress treatment method of the anther must be conducted.

Keywords: Chickpea, Genotype, Haploid, Anther, Auxin, Cytokinin, Concentration

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Nohut anter kültüründe oksin çeşidi (2,4-D ve Picloram) ve konsantrasyonu (5 mg/l, 10 mg/l; 1 mg/l, 2 mg/l) ile sitokinin çeşidi (BAP ve Kin) ve konsantrasyonunun (0 mg/l, 0.5 mg/l) farklı nohut genotiplerinde haploid bitki oluşumuna etkisini saptamak amacıyla yürütülen bu araştırmada; Seçkin, İnci, Onur, Sezgin ve Hasanbey genotipleri test edilmiştir.

Söz konusu genotiplerin saksı ve arazi koşullarında yetiştirilen donör bitkilerinden hasat edilen 2-3 mm uzunluğundaki tomurcuklar 4 °C'de 7 gün süre ile muhafaza edildikten sonra, steril koşullarda sodyum hipoklorit çözeltisinde sterilize edilmiş ve içlerindeki anterler izole edilerek EDM ortamında kültüre alınmıştır.

Araştırmada, içerisinde 30 adet anter kültür edilen 60 x 15 mm boyutlarındaki petri kaplarının ortalama %16.4'ünde mikrobiyal enfeksiyon ortaya çıkmıştır. Enfeksiyon oranı genotip x besi ortamı kombinasyonuna bağlı olarak % 0 ile % 44.4 arasında değişmiştir.

Araştırmada 80 farklı genotip x besi ortamı kombinasyonu için kültüre alınan enfekte olmamış toplam 400 petri kabındaki 12000 anterden tüm faktör kombinasyonlarının ortalaması olarak % 6.4'ü kallus ve/veya embriyo oluşturmuştur. Anter reaksiyon oranı genotiplere bağlı olarak % 3.3 ile % 7.9 arasında değişmiş ve bu değişimin istatistiksel olarak önemli olduğu ortaya çıkmıştır. Sezgin % 7.9 olarak anter reaksiyon oranı ile en yüksek anter reaksiyon oranı gösteren genotip olmuştur. İnci, Onur ve Hasanbey çeşitleri istatistiksel olarak Sezgin çeşidi ile aynı istatistiksel gruba giren anter reaksiyon oranları göstermiştir. Araştırmada test edilen iki farklı oksin çeşidi (2,4-D ve Picloram) anter reaksiyon oranında istatistiksel olarak önemli farklılık yaratmıştır. 2,4-D içeren ortamlarda kültüre alınan anterlerin ortalama reaksiyon oranı % 9.3 olmasına karşılık, Picloram içeren ortamlarda kültüre alınan anterlerde ise % 3.5 olarak gerçekleşmiştir. Bu sonuçlara bakarak 2,4 D, Piclorama göre anter reaksiyon oranında daha etkili olduğu saptanmıştır.

Araştırmada oksin konsantrasyonunun anter reaksiyon oranı üzerindeki etkisi oksin çeşidine bağlı olarak değişmiştir. 2,4-D konsantrasyonunun 5 mg/l'den 10 mg/l'ye çıkartılması anter reaksiyon oranında istatistiksel olarak önemli derecede azalmaya neden olmasına karşılık, Picloram konsantrasyonunun 1 mg/l'den 2 mg'l'ye çıkartılması anter reaksiyon oranında istatistiksel olarak önemli derecede artışa neden olmuştur.

Araştırmada test edilen iki sitokinin çeşidi (BAP ve kinetin) anter reaksiyon oranında önemli derecede farklılık yaratmıştır. Nitekim, BAP içeren ortamlarda anter reaksiyon oranı ortalaması %5.8 olmasına karşılık, kinetin içeren ortamlarda %7.1 olmuş ve kinetinin anter reaksiyon oranı açısından BAP'a göre daha etkin olduğu ortaya çıkmıştır

Sitokininlerin anter reaksiyon oranı üzerindeki etkisinin genotiplere bağlı olarak önemli derecede farklılık gösterdiği saptanmıştır. Nitekim, araştırmada test edilen 5 nohut çeşidinden 4'ünde sitokin çeşitleri anter reaksiyon oranında önemli bir farklılık yaratmamasına karşılık, Sezgin çeşidinde kinetin BAP'a göre önemli derecede daha yüksek anter reaksiyon oranı sağlamıştır.

Varyans analizi sonuçları oksin çeşidi x oksin konsantrasyonu x sitokinin çeşidi interaksiyonunun istatistiksel olarak önemli olduğunu göstermiştir. Bu sonuç, sitokinin çeşitlerinin anter reaksiyon oranı üzerindeki etkisinin farklı oksin çeşidi x oksin konsantrasyonu kombinasyonlarında farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur. Nitekim, 5 mg/l 2,4-D + BAP içeren ortamlarda %9.5 olan anter reaksiyon oranı 5 mg/l 2,4-D + kinetin içeren ortamlarda %12.5 olmuş ve ortama sitokinin olarak BAP yerine kinetin ilavesi anter reaksiyon oranında önemli derecede artışa neden olmuştur. Buna karşılık 10 mg/l 2,4-D içeren ortamlarda sitokinin çeşidi anter reaksiyon oranında önemli bir farklılık yaratmamıştır. 1 mg/l picloram içeren ortamlarda da sitokinin çeşidi anter reaksiyon oranında önemli bir farklılık yaratmamıştır. 2 mg/l picloram içeren ortamlarda ise kinetin BAP'a göre anter reaksiyon oranında istatistiksel olarak önemli derecede artışa neden olmuştur

Sitokinin konsantrasyonunun anter reaksiyon oranını istatistiksel olarak

önemli derecede etkilediği saptanmıştır. Nitekim, sitokinin içermeyen ortamlarda % 3.8 olan anter reaksiyon oranı ortalaması, 0.5 mg/l sitokinin içeren ortamlarda % 9 olarak gerçekleşmiş ve ortamda sitokinin bulunması anter reaksiyon oranında önemli derecede artışa neden olmuştur.

Sitokinin konsantrasyonunun etkisinin genotiplere bağlı olarak değiştiği saptanmıştır. Seçkin çeşidinde sitokinin konsantrasyonu anter reaksiyon oranında istatistiksel olarak önemli bir farklılık yaratmamasına karşılık, diğer çeşitlerde besi ortamına 0.5 mg/l sitokinin ilave edilmesi anter reaksiyon oranında sitokinin içermeyen ortama göre istatistiksel olarak önemli derecede artışa neden olmuştur.

Kültüre alınan anterlerden oluşan kallus ve embriyolar kültür başlangıcından 6-8 hafta Grawel ve ark. (2009) tarafından önerilen embriyo olgunlaştırma (EMM) ortamına aktarılmıştır. Söz konusu ortamda 4 hafta kalan kalluslarda embriyolar belirgin hale gelmiş ve bazı kalluslarda kök rejenerasyonu başlamıştır. Bunun yanında bazı kallus ve embriyolarda kararma ve ölüm ortaya çıkmıştır.

EMM ortamında 4 haftalık kültür sonunda, olgunlaşan embriyolar Grewal ve ark. (2009) tarafından önerilen bitki rejenerasyon ortamına (PRM) aktarılmıştır. Kallus ve embriyolar rejenerasyon ortamında 2-3 gün içinde yeşil renk almıştır. Ancak, rejenerasyon ortamına aktarılan kallus ve embriyolardan sürgün rejenerasyonu gerçekleşmemiş ve rejenerasyon ortamında 4 hafta kalan kallus ve embriyolar, yeni rejenerasyon ortamına aktarılmalarına rağmen herhangi bir gelişme göstermemişler ve siyahlaşarak ölmüşlerdir.

Araştırmada haploid bitki rejenerasyonunun gerçekleşmemiş olmasının bir çok nedeni olabileceği, araştırmada test edilen genotipler yanında kullanılan besi ortamının bileşimi, donör bitkilerin yetişme koşulları, anterlere kültür öncesi ve sonrası sıcak veya soğuk stresi uygulanması, anterlerin kültür koşulları gibi bir çok faktörün araştırmada test edilen nohut genotiplerinin anterlerinden haploid bitki rejenere olmamasının nedeni olabileceği vurgulanmıştır.

Araştırmadan elde edilen bulgulara dayanarak, Ülkemizdeki nohut ıslah programlarında anter kültürü tekniğinden yararlanarak ıslah sürecinin

kısaltılabilmesi için, öncelikle ülkemiz nohut gen kaynaklarının anter kültürüne reaksiyon açısından test edilmesi ve anterlerden haploid bitki elde etme protokolünün optimizasyonuna yönelik olarak uygun besi ortamı, besi ortamı büyüme düzenleyicisi içeriği, kültür öncesi ve sonrası uygun stres yönteminin belirlenmesi ve anterler için uygun kültür koşullarının belirlenmesine yönelik araştırmaların yürütülmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı bana veren ve çalışmamın tüm aşamalarında her türlü desteği esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU'na sonsuz teşekkür ederim. Tarla koşullarında ve laboratuvar analizlerinin her safhasında yardım ve desteklerini esirgemeyen Öğr. Gör. Hasan Beytullah DÖNMEZ hocama Binai AHMED arkadaşıma ve laboratuvar görevlisi Mehmet Ali DOĞAN'a teşekkür ederim. Maddi manevi desteklerini esirgemeyen kuzenlerime ve arkadaşlarıma teşekkür ederim. Çevirilerimde bana yardımcı olan Sefer ORHAN hocama da teşekkür ederim.

Yine, hayatımın her döneminde, her zaman yanımda olan değerli aileme gönülden teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
ABSTRACT II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET III
TEŞEKKÜR VII
İÇİNDEKİLER VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ X
ŞEKİLLER DİZİNİ XII
1.GİRİŞ 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 7
2.1. Yemeklik Dane Baklagillerde Katlanmış Haploidler ve Elde Edilme Yöntemleri 7
2.2. Yemeklik Dane Baklagillerin Anter Kültüründe Başarıyı Etkileyen Faktörler 11
2.3. Nohutta Anter Kültürü Çalışmaları 13
3. MATERYAL VE YÖNTEM 19
3.1. Materyal 19
3.2. Yöntem 19
3.2.1. Donör Bitkilerin Yetişme Koşulları 19
3.2.2. Donör Bitkilerden Tomurcukların Hasadı 23
3.2.3. Soğuk Ön Muamelesi 26
3.2.4. Deneme Planı 26
3.2.5. Kullanılan Besi Ortamı ve Besi Ortamının Hazırlanması 26
3.2.5.1. Makro ve Mikro Elementlerin Stok Solüsyonlarının Hazırlanması 27
3.2.5.2. Jelat ($FeSO_4$ $7H_2O$ ve Na_2EDTA) Hazırlanması 27
3.2.6. Tomurcukların Sterilizasyonu ve Anterlerin Besi Ortamına Yerleştirilmesi 34

3.2.7. Anterlerden Embriyoid Oluşumu 37
3.2.8. Bitki Rejenerasyonu 38
3.2.9. Denemeden Elde Edilen Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi 38
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA 39
4.1. Kültürlerde Enfeksiyon Oranı 39
4.2. Anterlerin Reaksiyon Göstermesi 46
4.3. Anter Reaksiyon Oranı 48
4.4. Bitki Rejenerasyonu 58
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 65
KAYNAKLAR 69
ÖZGEÇMİŞ 81

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 3.1. Araştırmada Kullanılan Besi Ortamları 28
Çizelge 4.1. Farklı genotip x besi ortamı kombinasyolarında enfeksiyon oranları (%) 42
Çizelge 4.2. Farklı nohut genotipi anterlerinin farklı besi ortamı kombinasyonlarında reaksiyon gösterme oranları ile ilgili varyans analizi sonuçları 49
Çizelge 4.3. Farklı Nohut Genotiplerinde Anterlerin Farklı Oksin Çeşit ve Konsantrasyonlarını İçeren Ortamlardaki Reaksiyonu Oranı Ortalamaları (%) 50
Çizelge 4.4. Farklı Nohut genotiplerinde anterlerin farklı sitokinin çeşit ve konsantrasyonlarını İçeren ortamlardaki reaksiyonu oranı ortalamaları (%) 53
Çizelge 4.5. Nohut anterlerinin farklı oksin çeşit ve konsantrasyonları ile farklı sitokinin çeşidi içeren besi ortamlardaki anter reaksiyonu oranı ortalamaları (%) 55
Çizelge 4.6 Farklı nohut genotiplerinde anterlerin farklı konsantrasyonlarda sitokinin içeren besi ortamlarında reaksiyonu oranı ortalamaları (%) 57

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 3.1 Saksılarda çıkış yapmış nohut fideleri 19
Şekil 3.2 Üzerine file çekilmiş nohut fideleri 19
Şekil 3.3 Her birinde 3 nohut fidesi bulunan saksılar 21
Şekil 3.4 Tarla koşullarında çıkış yapan nohut fideleri 22
Şekil 3.5 Tarla koşullarında donör nohut bitkileri 22
Şekil 3.6 Nohut Anterleri 23
Şekil 3.7 Nohut anterlerinden mikrospor safha incelmesi için preparat hazırlama 24
Şekil 3.8 Tek çekirdekli safhada nohut mikrosporu 24
Şekil 3.9 Anter kültürü için uygun boyuttaki nohut tomurcuğu 25
Şekil 3.10 Tarla koşullarında uygun boyutta tomurcukları içeren nohut bitkileri 25
Şekil 3.11 Karşım I'in hazırlanması 30
Şekil 3.12 Hazırlanmış karışım II çözeltisi 32
Şekil 3.13 Karşım II varyantlarında pH ayarlanması 32
Şekil 3.14 Karşım II varyantlarının steril filtreden geçirilmesi 33
Şekil 3.15 Besi ortamı varyantlarının petri kaplarına boşaltılması 33
Şekil 3.16 İçinde besi ortamı bulunan petri kaplarının plastik muhafaza kaplarına yerleştirilmesi 34
Şekil 3.17 Tomurcukların sterilize edilmesi 35
Şekil 3.18 Steril hale getirilmiş tomurcuklar 36
Şekil 3.19 Tomurcuklardan anterlerin izole edilmesi 36
Şekil 3.20 İzole edilen anterlerin besi ortamına yerleştirilmesi ve kültür kaplarının etiketlenmesi 37
Şekil 4.1 Kültürlerde mantar enfeksiyonu 39
Şekil 4.2 Kültürlerde bakteri enfeksiyonu 40
Şekil 4.3 Kültürlerde bakteri ve mantar enfeksiyonu 40
Şekil 4.4 Farklı genotip-besi ortamı kombinasyonlarında enfeksiyon

oranları (%) 45
Şekil 4.5 Anterlerde şişme ve beyazlaşma (Kültür başlangıcından iki hafta sonra) 46
Şekil 4.6 Kültüre alınan anterlerde sulumturak, yumuşak yapılı kallus oluşumu (Kültür başlangıcından dört hafta sonra) 47
Şekil 4.7 Kültüre alınan anterlerde sert yapılı, embriyogenik kallus oluşumu (Kültür başlangıcından dört hafta sonra) 47
Şekil 4.8 Embriyogenik kalluslar üzerinde somatik embriyo oluşumu (Kültür başlangıcından 6 hafta sonra) 48
Şekil 4.9 Farklı oksin çeşit ve konsantrasyonlarının anter reaksiyon oranına etkisi 52
Şekil 4.10 Farklı nohut genotiplerinde farklı sitokinin çeşitlerinin anter reaksiyon oranına etkisi 54
Şekil 4.11 Farklı oksin çeşit ve konsantrasyonu ile farklı sitokinin çeşidi içeren besi ortamlarında anter reaksiyon oranı 56
Şekil 4.12 Farklı genotiplerde farklı sitokinin konsantrasyonlarının anter reaksiyon oranına etkisi 58
Şekil 4.13 EMM ortamına aktarılan kallus ve embriyolar (Kültür başlangıcından 6-8 hafta sonra) 59
Şekil 4.14 EMM ortamında kalluslarda ortaya çıkan ok ucu şeklindeki embriyolar (Kültür başlangıcından 10-12 hafta sonra) 59
Şekil 4.15 EMM ortamında olgun embriyolar ve kök rejenerasyonu (Kültür başlangıcından 10-12 hafta sonra) 60
Şekil 4.16 EMM ortamında kallus ve embriyolarda kuruma 60
Şekil 4.17 Rejenerasyon ortamına aktarılan kallus ve embriyolar (Kültür başlangıcından 10-12 hafta sonra) 61
Şekil 4.18 Rejenerasyon ortamına aktarılan kallus ve embriyolarda klorofil oluşumu 61

SİMGELER VE KISALTMALAR

2,4 D : 2,4-Dikolorofenoksiasetik asit

ABA :Absisik Asit

B5 ortamı: Gamborg ve ark. (1968) ortamı

BAP : 6-Benzil Amino Purin

cc :Santimetre Küp

^{o}C : Derece

cm : Santimetre

da : Dekar

EDM :Embriyo Geliştirme Ortamı

EDTA : Ethilendiamintetra asetik asit

EMM :Embriyo Olgunlaştırma Ortamı

G :Genotip

g : Gram

GA3 . : Giberellik Asit

IAA : Indol-3-asetik asit

kg : Kilogram

Kin : Kinetin

L : Litre

m : Metre

mg : Miligram

ml : Mililitre

mm : Milimetre

MS ortamı: Murashige ve Skoog (1962) ortamı

NAA : α Naftalin asetik asit

OÇ : Oksin Çeşidi

OK : Oksin Konsantrasyonu

Pic : Picloram

PRM : Bitki Rejenerasyon Ortamı

SÇ :Sitokinin Çeşidi

SK :Sitokinin Konsantrasyonu

1.GİRİŞ

Mercimek, fasulye, nohut, bezelye, bakla ve börülceyi içine alan dane baklagiller, dünyadaki iki milyardan fazla insan için protein kaynağıdır (Burucu, 2020). Dünyada insan beslenmesindeki bitkisel proteinlerin %22'si ve karbonhidratların %7'si, hayvan beslenmesindeki proteinlerin %38'i ve karbonhidratların da %5'i yemeklik tane baklagillerden sağlanmaktadır. Bunun yanında, havanın serbest azotunu toprağa bağlama özelliklerinden dolayı ve ekim nöbetine alınmaları ile kazık kökleri sayesinde toprağın verimliliğini artırmaları, tuzlu topraklarda ve nadas alanlarında toprak yapısının iyileştirilmesine katkı sağlamaları gibi pek çok amaca hizmet etmeleri, dane baklagillerin bitkisel üretimdeki önemini daha da artırmaktadır (TMO, 2020).

Baklagiller, tarla bitkileri yetiştiriciliğinde, ekim alanı ve üretim bakımından tahıllardan sonra gelen tane ürünüdür (UBK, 2014). Dünyada yaklaşık 1,5 milyar hektar olan tarım alanlarının 78 milyon hektar alanında toplam 66 milyon ton civarında değeri 40 milyar dolar olan yemeklik baklagil üretimi gerçekleştirilmektedir (TMO, 2020). Dünya üzerinde en çok üretilen baklagil türü kuru fasulye olup bunu, nohut, bezelye, börülce, mercimek ve bakla takip etmektedir.

Türkiye, baklagillerin gen merkezi olarak kabul edilen "Verimli Hilal"in en önemli parçasıdır. Türkiye'de en fazla yetiştirilen yemeklik baklagiller ise nohut, mercimek ve kuru fasulyedir. Ülkemizin hemen hemen her bölgesinde yetiştirilen yemeklik tane baklagiller Türk mutfağının ve özellikle dar gelirli ailelerin protein kaynağını oluşturmaktadır. Baklagiller, istihdama olan katkıları, ihracat potansiyelleri, ekim nöbetine kolayca girebilmeleri, nadas alanlarının azaltılmasında etkili olmaları, besin değeri yönünden zengin olmaları nedeniyle üretim ve tüketimde önemli bir ürün grubudur. Ülkemizde bitkisel ürün üretiminde baklagiller büyük önem taşımaktadır. Özellikle 1980'li yıllardan itibaren yemeklik tane baklagillerin üretimine büyük önem verilmeye başlanmış ve ülke genelinde

uygulanan üretimi artırıcı çeşitli projelerin sayesinde bakliyat üretimimiz önemli ölçüde artış göstermiştir. Nitekim, 1980'li yılların sonunda 2 milyon hektara kadar çıkan dane baklagil ekim alanı, sosyo-ekonomik nedenlerle 1990'lı yıllarda azalma göstermiş ve 2020 yılında ülkemizde 871 134 ha alanda dane baklagil üretimi yapılmıştır (TÜİK, 2021). Söz konusu alanın % 58.7'sinde nohut, % 28.4'ünde mercimek, % 11.8'inde fasulye, % 0.4'ünde bakla ve geriye kalanında ise bezelye ve börülce yetiştirilmiştir.

Baklagil üretimi ülke geneline yayılmış olmakla beraber özellikle Güneydoğu Anadolu, Orta Anadolu ve geçit bölgeleri ile Marmara Bölgesi'nin güney kesiminde yoğun olarak yapılmaktadır. Genel olarak; kırmızı mercimek Güneydoğu'da, yeşil mercimek, nohut ve kuru fasulye Orta Anadolu ve geçit bölgelerinde, bakla ve bezelye ise Ege ve Güney Marmara'da yetiştirilmektedir.

Ülkemizin 2018 yılı toplam dane baklagil üretimi 1 296 867 ton olup, bunun içerisinde nohutun payı % 48.6, mercimeğin payı % 28.6, fasulyenin payı % 21.6, baklanın payı % 0.7, bezelye ve börülcenin payı ise toplam % 0.5'tir. (TÜİK, 2021). Türkiye, mercimek ve nohut üretimi açısından dünyada 4. sırada, fasulye üretimi açısından ise 21. sırada yer almaktadır (FAO,2021).

Yukarıdaki açıklamalardan anlaşılacağı gibi ekim alanı ve üretim miktarı bakımından ülkemizde en fazla üretilen yemeklik dane baklagil bitkisi nohuttur. Nohut (*Cicer arietinum* L.), gerek ülkemizde, gerekse dünyada, özellikle Yakın Doğu, Uzak Doğu, Akdeniz, Güney Amerika ve Orta Amerika ülkelerinde çok eski yıllardan beri kültüre alınan, insan ve hayvan beslenmesinde ve yeşil gübrelemede kullanılan bir yıllık bir baklagil bitkisidir (Eser, 1976; Reddy vd Singh, 1984; Reddy ve Kabbabeh, 1985, Altaf ve Ahmad, 1990). Dane protein içeriği % 20-22 arasında değişir (Williams ve Singh, 1987). Tane kabuğunun içeriğinde bulunan yüksek orandaki selüloz ve kalsiyum insan beslenmesinde önemli yer tutmaktadır. Danesinde genetik mühendisliği teknikleri ile geliştirilen bir çeltik çeşidi olan ''Altın Çeltik'''ten daha fazla β -karoten içerir (Abbo ve ark., 2005). Ayrıca sap ve samanının tahıllara göre iki kata kadar daha kaliteli protein içermesinden dolayı da

hayvan beslenmesinde önemli bir yere sahiptir (Ercan ve ark., 2005). 14 kg/da'a kadar azot fikse edebilir ve azot gereksiniminin % 80'ini bu yolla karşılar (Saraf ve ark., 1998). Kendisinden sonra gelen bitkiye önemli miktarda azot bırakır.

Nohut (*Cicer*) cinsi *Fabaceae* familyası, *Papilionoideae* alt familyasında yer alan bir cinstir (Millan ve ark., 2015). Önceleri *Vicieae* oymağında yer alan nohut daha sonra *Cicereae* oymağına taşınmıştır (Kupicha, 1977). Nohut cinsi **(***Cicer*) bir yıllık veya çok yıllık otsu veya çok yıllık çalı olmak üzere 44 taksonu içinde barındırır. Bunlardan 9 adedi bir yıllık, 35 adedi ise çok yıllıktır (Altaf ve Ahmad, 1990; Smykal ve ark., 2015). Bir yılık türler; *C. arietinum, C. bijugum, C. chorassanicum, C. cuneatum, C. echinospermum, C. judaicum, C. pinnifidum, C. reticulatum ve C. yamashitae'dır.* Bu türlerin tamamında somatik kromozom sayısı 16'dır ve kültür nohutunun (*Cicer arietinum* L.) genom büyüklüğü 738 Mb'dır (Varshney ve ark., 2013) . Kültür nohutunun tohum ve çiçeklerinin büyüklüğü ve rengi ile bitkinin pigmentasyonuna bağlı olarak kabuli (makrosperma) ve desi (mikrosperma) olmak üzere iki farklı tipi mevcuttur (Muehlbauer ve Singh, 1987). Her iki kültür nohutu tipinin Güneydoğu Anadolu Bölgesi ve Kuzey Suriye'de doğal olarak yayılım gösteren (Zohary ve Hopf, 2000; Toker, 2009) Cicer reticulatum türünden türediği düşünülmektedir (Ladizinsky ve adler, 1976).

Nohut Neolitik dönemde keşfedilen bir bitkidir ve Verimli Hilal'daki orijini 10 000 yıl öncesine kadar gitmektedir (Zohary ve Hopf, 2000; Pratap ve Kumar, 2011). Yapılan araştırmalar bitkinin orijin merkezinin Güneydoğu Anadolu ve Suriye olduğunu göstermiştir (Van der Maesen, 1987). Kültür nohutunun atası olarak kabul edilen *Cicer reticulatum* türüne söz konusu bölgede bugün bile rastlanmaktadır. Burdur'un Hacılar köyünde yapılan kazılarda M.Ö. 5450 yılına ait nohut tohumlarına rastlanmıştır (Helbaek, 1970). Nohut orijin merkezinden birisi ilkbahar ve yaz aylarında yetiştiği bölgenin batısına doğru diğeri ise serin kurak sezonda yetiştiği güneye doğru olmak üzere iki yöne doğru yayılım göstermiştir.

Bir çok araştırma nohutun dar bir genetik tabana dayandığını göstermektedir (Mallikarjuna ve ark.,2011). Bu nedenle bitki birçok hastalık ve zararlıya karşı çok

hassastır. Özellikle *Ascochyta rabiei* mantarının neden olduğu antraknoz hastalığı, *Fusarium oxysporum* mantarının neden olduğu solgunluk hastalığı ve nedeni tam olarak bilinmeyen cücelik hastalığı nohutun en önemli tahrip edici hastalığıdır ve bu hastalıklar gerek ülkemizde ve gerekse dünyada nohut tarımını önemli ölçüde sınırlamaktadır.

Nohut kendine döllenen bir bitkidir (Malhotra ve Singh, 1986). Nohut ıslahında pedigri yöntemi, toptan seçme yöntemi, geriye melezleme ve çoklu melezleme gibi kendine döllenen bitkilerde uygulanan klasik ıslah yöntemleri kullanılmaktadır. Ayrıca, mutasyon ıslahı da nohut ıslahında kullanılan yöntemlerden birisidir. Ancak, söz konusu yöntemler, çok fazla zaman ve iş gücüne gereksinim duymaktadır. Yirminci yüzyılda geliştirilen ve yüzyılın son çeyreğinde kültür bitkilerinde uygulanmaya başlanan biyoteknolojik yöntemler klasik bitki ıslahı yöntemlerine yardımcı yöntemler olarak ıslah sürecini kısaltmakta ve gereksinim duyulan işgücünü azaltmaktadır. Ancak, söz konusu yöntemlerin bir bitkide kullanılabilmesi için öncelikle yapılacak araştırmalarla yöntemin bitki türündeki kullanılma esaslarının belirlenmesi gerekmektedir.

Bitkilerde ıslah sürecini kısaltmak amacıyla kullanılan biyoteknolojik yöntemlerden birisi uzak akrabalar arası melezlemeler sonucu oluşan haploid embriyolar veya eşey hücrelerinin in vitro koşullarda kültür edilerek haploid bitkilerin elde edilmesi ve bu haploid bitkilerde kromozom katlaması yaparak kısa sürede homozigot safhatların elde edilmesini sağlayan haploid bitki elde etme tekniğidir (Hatipoğlu, 2008). Teknik, haploid bitki elde edilmesinde kullanılan eksplanta bağlı olarak anter kültürü, mikrospor kültürü, gynogenesis veya maternal haploid tekniği olmak üzere farklı isimler almaktadır.

Bugüne kadar sürdürülen dane baklagiller anter kültürü araştırmalarında, donor bitkilerin genotipi ve yetişme koşulları, kültüre alınacak anterlerin içinde bulunduğu tomurcukların büyüklüğü ve anterler içindeki mikrosporların gelişme dönemi, stres uygulamaları, besi ortamının bileşimi ve kültür sıcaklığı gibi

faktörlerin anterlerden haploid bitki rejenerasyonunu etkilediği saptanmıştır (Deswal, 2018).

Bu araştırma nohut anter kültüründe genotip ve besi ortamının büyüme düzenleyicisi içeriğinin anterlerden haploid bitki rejenerasyonuna etkisinin saptanması amacıyla planlanmış ve yürütülmüştür.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Yemeklik Dane Baklagillerde Katlanmış Haploidler ve Elde Edilme Yöntemleri

Haploid bitki, gametik kromozom sayısına sahip bitkidir (Kasha ve Maluszynski, 2003; Bhojwani ve Dantu, 2010). Eşeysel üreme yeteneğinde olmayan haploid bitkilere farklı antimitotik kimyasalların farklı yöntemlerle uygulanması ile bitkilerde kromozom katlaması yapılır ve bitkiler fertil hale getirilir. Elde edilen bu fertil ve homozigot bitkilere katlanmış haploid bitkiler denir (Hatipoğlu, 2008). Bitki ıslahında katlanmış haploid bitkilerin elde edilmesinin amacı; çeşit olarak veya melez çeşit ıslahında ebeveyn olarak kullanılabilecek homozigot ve homojen hatları elde etmektir (Gatti ve ark., 2016). Ayrıca, katlanmış haploid bitkiler kantitatif genetik araştırmalarında rekombine edilmiş kendilenmiş hatlar olarak kullanılırlar (Burr ve ark., 1988). Ayrıca, katlanmış haploidler mutasyon araştırmalarında resesif, dominat ve zararlı mutasyonların ortaya çıkartılmasında kolaylık sağlarlar (Szarejko ve Forster, 2007). Bu bitkiler, geriye melezleme çalışmaları, gen haritalama, evrim araştırmaları, gen tanımlama ve transgenik bitki geliştirme çalışmaları için de uygun materyali oluştururlar (Kumar ve Choudhary, 2020).

Doğada haploid bitkiler ilk defa *Datura stramonium* bitkisinde çalışan Bergner tarafından gözlenmiştir (Kasha ve Maluszynski, 2003). Daha sonra birçok bitkinin doğal haploidleri saptanmıştır. Doğada haploid bitkilerine rastlanabilen bitki türü sayısı 100'den fazladır (Hatipoğlu, 2008). Söz konusu doğal haploidler parthenogenesis veya apomixis mekanizmaları sonucu ortaya çıkmaktadır. Ancak, söz konusu doğal haploidlerin ortaya çıkış frekansları % 0.001 civarındadır (Kumar ve Choudhary, 2020). Chase (1952), haploidleri bitki ıslahında kullanmayı deneyen ilk araştırıcı olmuştur. Araştırıcı, yumurta hücresinin döllenmeden embriyoyu oluşturması (Parthonogenesis) sonucu oluşan düşük frekanstaki haploid bitkileri seçmiş ve bunlarda kromozom katlaması yaparak katlanmış haploid bitkileri elde etmiştir. Parhenogenesis yoluyla haploid bitki oluşum frekansının artırılması için

ışınlanmış polenlerle tozlama, ikiz embiyolu tohumların seçilmesi, geç tozlama gibi birçok yöntem denenmiştir. Guha ve Maheshwari (1964), *Datura innoxia* bitkisinin anterlerini in vitro koşularda kültüre alarak ilk defa embriyoları elde etmişlerdir. Daha sonra Bourgin ve Nitsch 1967 yılında *Nicotiana tabacum ve N. sylvestris* türlerinde ilk defa anterlerin in vitro koşullarda kültüründen haploid bitkileri elde etmişlerdir (Pandey, 1973). Bu durum bitki ıslahçılarının haploid bitkilere olan ilgisini artırmıştır.

Haploid bitkilerin ıslahtaki kullanım alanları nedeniyle haploid bitkilerin elde edilmesi için değişik yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden birisi olan indüzer hatlardan yararlanarak haploid tohumların elde edilmesi yöntemi mısır bitkisinde uygulanabilmektedir (Geiger ve Gordillo, 2009). Nohut bitkisinde mutasyon yoluyla elde edilen kabuli tip bir erkek kısır hattın fertil bir desi tip bitkiyle melezlenmesi sonucu oluşan tohumların yaklaşık % 30'unun haploid olduğu saptanmıştır (Reddy ve Reddy, 1996). Söz konusu teknik in vitro kültüre gereksinim duymayan bir tekniktir. Haploid bitkiler in vitro teknikler kullanılarakda elde edilmekte olup, bu tekniklerin bir bölümü belirli bitki türlerine özel olmasına karşılık, bazıları çok daha fazla bitki türünde uygulanabilmektedir. 1970 yılında Kasha ve Kao tarafından arpada uygulanan uzak akarabalar arası melezlemede kromozom eleminasyonu sonucu haploid embriyoların oluşması ve yaşama yeteneğinde olmayan bu embriyoların in vitro koşullarda kültür edilerek haploid bitkilerin elde edilme tekniği genellikle arpa, buğday, çavdar, yulaf gibi serin iklim tahıllarına özel bir tekniktir (Kasha ve Kao, 1970). Yine in vitro koşullarda bitkilerin erkek gametlerinden haploid bitkilerin elde edilmesini amaçlayan anter ve mikrospor kültürleri ile dişi gametlerden haploid bitki elde edilmesini amaçlayan ovül veya ovary kültürü her bitki türünde uygulanma olanağı olan evrensel haploid bitki elde etme teknikleridir (Kasha ve Maluszynski, 2003). Haploid bitkilerin elde edilmesinde yeni teknik olarak son yıllarda CENH3 sentromerlerine sahip mutantların kullanılması ile haploid bitkilerin elde edilmesi tekniğidir (Comai, 2014; Tek ve ark., 2015). Bu teknikte mutant bitki baba veya ana olarak kullanılmakta ve

normal bitki ile melezlenmekte ve eğer mutant bitki baba olarak kullanılmışsa ana bitkide oluşan tohumların % 4-5'i, ana olarak kullanılmışsa mutant bitkide oluşan tohumların % 25-45'i haploid olmaktadır (Wang ve ark., 2019). Bu sistemde döllenme sonucu oluşan zigotta mitoz bölünme sırasında mutant ebeveynin kromozomları kutuplara çekilmeyerek hücre içinde kaybolmakta ve yalnızca mutant olmayan ebeveynin kromozomlarını taşıyan haploid tohumlar oluşmaktadır. Bu teknik *Arabidopsis thaliana* bitkisinde uygulanmış ve diğer bitkilerde uygulanabilmesi için yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Son yıllarda CENH3 mutantlarının elde edilmesinde bir gen düzenleme tekniği olan CRISPR/Cas9 tekniğinden yararlanılmaktadır(Kuppu ve ark., 2020).

Yukarıda açıklanan haploid bitki elde etme teknikleri arasında en yaygın kullanılanı anter veya mikrospor kültürü tekniğidir (Thomas ve ark., 2003). Bu teknik kullanılarak çok sayıda bitki türünde haploid bitki elde edilebilmiş olmasına karşılık, diğer haploid bitki elde etme teknikleri daha çok belirli bir bitki grubunda veya bitki türünde başarılı olmaktadır. Tütün, buğday, arpa, kanola, çeltik ve mısır gibi ekonomik öneme sahip kültür bitkilerinin ıslah programlarında anter veya mikrospor kültürü ile elde edilen katlanmış homozigot hatlar çok yaygın olmamakla beraber kullanılmaktadır (Thomas ve ark., 2003).

Yemeklik dane baklagil bitkileri in vitro metodların çoğunluğuna iyi reaksiyon göstermemeleri ile bilinir ve bu in vitro yöntemlere katlanmış haploid bitki elde etme teknikleri de dahildir (Ochatt ve ark. 2009 ; Lülsdorf ve ark., 2011). Bununla beraber başarılı bitki rejenerasyon protokollerinin geliştirilmesi için anter kültürü protokollerinin iyileştirilmesine yönelik yoğun çabalar harcanmıştır ve bu çabalar devam etmektedir (Pratap ve ark., 2018). Nohut (Khan ve Gosh, 1983; Altaf ve Ahmad, 1986; bajaj ve Gosal, 1987; Croser, 2002; Vessal ve ark, 2002; Kennedy ve ark., 2002; Croser ve ark., 2004; Croser ve ark., 2005; Grewal ve ark., 2009; Croser ve ark, 2011; Lulsdorf ve ark, 2012; Panchangam ve ark., 2014; Rashidi ve ark., 2019; Özer, 2020), fasulye (Peters ve ark., 1977; Munoz-Floerz ve Baudoin, 1994 a ve b; Munoz ve Baudoin, 2002), bezelye (Gupta ve ark, 1972; Gupta, 1975;

Gosal ve Bajaj, 1988; Croser ve ark., 2005; Bobkov, 2010; Lulsdorf ve ark, 2012; Bobkov, 2014; Ribalta, 2014; Davies, 2015; Bermejo ve ark., 2020), acı bakla bitkisinde (Ormerod va Caligari, 1994; Bayliss ve ar., 2004; Skrzypek ve ark., 2008; Kozak ve ark., 2012) ve mercimek bitkisinde (Keller ve Ferrie, 2002; Croser ve Lulsdorf, 2004; Lulsdorf ve ark, 2012; Davies, 2015), soya fasulyesinde (Zhao ve ark., 1998; de Moraes ve ark., 2004; Rodrigues ve ar., 2004) ve güvercin bezelyesinde (Bajaj ve ark., 1980), börülcede (Arya ve Chandra, 1989) anter ve mikrospor kültür sistemlerini geliştirmek için yoğun araştırmalar yürütülmüştür.

Yemeklik dane baklagillerde ilk anter kültürü protokolü geliştirme çalışması bezelyenin B22 hattı ile yapılmıştır (Gupta ve ark., 1972). Bu çalışmada kallus elde edilmiş, ancak kallus polidi düzeyi ve dolayısıyla orjini belirlenememiştir. Elde edilen bu kallustan 36 ay sonra bir kaç kök, sürgünler ve torpedo şeklinde embriyolar elde edilmiştir. Söz konusu yapılan polidi düzeyleri belirlenememiştir (Gupta, 1975). Bu çalışmalardan sonra farklı yemeklik dane baklagil türlerinde anterlerden yeşil bitki elde etmek için farklı besi ortamı kombinasyonları denenmiştir (Pratap ve ark., 2018). Bununla beraber ilk çalışmaların başladığı bezelyede bile henüz anterlerden rutin olarak haploid bitkilerin elde edilebildiği bir protokol bulunmamaktadır. Androgenesis orijinli haploid embriyolar güvercin bezelyesinde (*Cajanus cajan*) değiştirilmiş MS ortamında başarıyla elde edilmiştir (Bajaj ve ark., 1980). Gosal ve Bajaj (1988) bezelyenin Bonneville çeşidi ve iki hattında anterlerden kallus elde etmeyi başarmışlardır. Bu kalluslardan bir kaç kalp şeklinde embriyo gelişmiş ancak bu embriyolardan bitki rejenere olmamıştır. Diğer taraftan elde edilen kallus hücrelerinin % 90'nın diploid olduğu, dolayısıyla kallus mikrospor orijinli değil, anter somatik dokularından ortaya çıktığı saptanmıştır. Nohutta anter kültürü ile haploid bitkilerin elde edilmesi amacıyla araştırmalar yürütülmüştür (Croser, 2002; Croser ve ark., 2004; Vessal ve ark., 2002; Grewal ve ark., 2009).

2.2. Yemeklik Dane Baklagillerin Anter Kültüründe Başarıyı Etkileyen Faktörler

Diğer bitki gruplarında olduğu gibi yemeklik dane baklagillerde de anter kültüründe başarı bir çok faktör tarafından etkilenir (Gatti ve ark., 2016; Pratap ve ark., 2018). Bu faktörler arasında; genotip, donor bitkilerin yetişme koşulları, anter kültürü için anterlerin izolasyonu sırasında mikrosporların gelişme dönemi, anterler izole edilmeden önce çiçek tomurcuklarına ön uygulama yapılması, kültür ortamı ve kültür koşulları sayılabilir (Germana, 2006; Lulsdorf ve ark., 2011, Gatti ve ark, 2016; Paratap ve ark, 2018).

Diğer in vitro kültür tekniklerinde olduğu gibi anter kültüründe de başarıyı etkileyen en önemli faktör genotiptir (Gosal ve Bajaj, 1988; Zhao ve ark., 1998; Croser, 2002; Kennedy ve ark., 2003; Vessal ve ark., 2002; Croser ve Lulsdorf, 2004; Ochatt ve ar., 2009; Grewal ve ark., 2009; Bobkov, 2010; Croser ve ark., 2011; Bobkov, 2014; Ribalta, 2014; Panchangam ve ark., 2014; Davies, 2015; Deswal, 2018; Abdollahi ve Rashidi, 2018; Bermejo ve ark., 2020; Özer, 2020).

Donör bitkilerin fizyolojik durumu anterler içindeki mikrosporların canlılığı ve sayısı üzerinde etkilidir. Donor bitkilerin fizyolojik durumunu etkileyen en önemli faktörler ise ışık intensitesi, fotoperyot ve beslenme durumudur (Silva, 2012). Croser ve ark., (2011), donor bitkilerin büyüme sezonunun nohut mikrospor kültüründe önemli etkiye sahip olduğunu saptamışlardır. Araştırıcılar kışın ve ilkbaharda büyüyen bitkilerden hasat edilen tomurcuklardaki mikrosporların yazın büyüyen bitkilerde hasat edilenlere göre mikrospor kültüründe daha iyi reaksiyon gösterdiğini saptamışlardır. Özel, tarla koşullarında yetiştirilen nohut bitkilerinden izole edilen anterlerin sera koşullarında yetiştirilenlere göre daha yüksek oranda embriyogenik kallus oluşturduğunu saptamıştır.

Türlere göre değişmekle beraber genellikle androgenesis için mikrosporların en fazla reaksiyon gösterdiği mikrospor gelişme safhasının orta tek çekirdekli dönem ile orta çift çekirdekli dönem arasında olduğu konusunda görüş birliği vardır (Deswal, 2018; Gatti, 2016). Bezelyede tek çekirdekli safhadaki mikrosporların

genel olarak tüm geneotiplerde androgenesis için en uygun safha olduğu saptanmıştır (Croser ve ark., 2006; Ochatt ve ark., 2009). Benzer şekilde tek çekirdekli safhadaki nohut mikrosporlarının androgenesis için en uygun safha olduğu saptanmıştır (Grewal ve ark., 2009). Nohutta açık sarı renkli yarı saydam anterleri içeren 2-3 mm uzunluğundaki tomurcukların söz konusu gelişme safhasındaki mikrosporlara sahip anterleri içerdiği saptanmıştır (Panchangam ve ark., 2014). Kozak ve ark. (2012), mavi acı baklada (*Lupinus angustifolius*) çiçek durumunun orta bölümünde bulunan 5-6 mm uzunluğundaki tomurcukların anter kültürü için en uygun tomurcuklar olduğunu saptamışlardır.

B5 ve MS temel besi ortamlarının baklagillerde gelişmekte olan mikrosporların gelişmesi için gerekli besinleri karşıladığı saptanmıştır (Croser ve ark., 2006). Ancak, ortamdaki nitrat azotu/ amonyum azotu oranının optimize edilmesi gerekmektedir. Dane baklagillerde anter kültürü için sakkarozun uygun bir karbonhidrat kaynağı olduğu, ancak konsantrasyonunun türlere bağlı olarak değiştiği bildirilmiştir (Croser ve ark., 2006). Ortamın osmotik basıncı andogenesisi önemli ölçüde etkilediği nohutta (Croser ve rk., 2005; Grewal, 2009) ve bezelyede (Croser ve ark., 2006; Ochatt ve ark., 2009) saptanmıştır. Nohutta yapılan araştırmada en iyi reaksiyon 7 gün osmotik stres uygulaması (% 17 sakkaroz içeren ortamda) ve daha sonra anterlerin % 10 sakkaroz içeren ortama aktarıldığında elde edilmiştir (Deswal, 2018). Besi ortamına myo inositol, nikotinik asit, pyridoksin gibi vitaminlerin ve glutamin gibi amino asitlerin ilavesi mikrosporlardan embriyo oluşumunu teşvik etmektedir (Croser ve ark., 2006). Lulsdorf ve ark. (2011), baklagillerde androgenesisin büyüme düzenleyicileri aracılığıyla uyarıldığı ve anterlere farklı stresler uygulandıktan sonra oksinlerin androgenesiste ana rol oynadığını saptamışlardır. Besi ortamına genellikle oksin olarak 2,4-D, Dicamba, IAA, NAA, IBA ve sitokinin olarak Kinetin veya BAP ilave edilmektedir (Croser ve ark., 2006). Anterlere kültür öncesi soğuk veya sıcak uygulaması veya elektroporasyon uygulaması dane baklagil anter kültüründe yaygın olarak yapılan stres

uygulamalarıdır (Bobkov, 2010 ve 2014; Ribalta, 2014; Davies, 2015; Grewal ve ark., 2009).

2.3. Nohutta Anter Kültürü Çalışmaları

Nohut bitkisinde ilk anter kültürü araştırmasını Khan ve Ghosh (1983) yapmışlardır. Araştırıcılar, 2 mg/l 2,4-D ve % 10 Hindistan cevizi sütü içeren MS ortamında B108 nohut hattının anterlerini kültüre almışlar ve kallus yanında bir kaç embriyoid elde etmişler, fakat bitki elde etmeyi başaramamışlardır.

Altaf ve Ahmad (1986), nohut anterlerine 3-7 gün 4 °C'de soğuk uygulaması ve 45 dakika 1000 devir/dakika santrifüj uygulaması yaptıktan sonra kültüre almışlar ve anterlerden kallus elde etmişlerdir. Fakat bu kalluslardan bitki elde edilememiştir. Elde edilen kallusun ploidi düzeyi belirlenmemiştir.

Bajaj ve Gosal (1987), 4 mg/l IAA ve 2 mg/l kinetin içeren MS ortamında kültüre aldıkları nohut anterlerinden embriyoidler elde etmişlerdir.

Huda ve ark. (2001), 5 nohut çeşidinin tomurcuklarına 3-7 gün 4 ℃'de soğuk uygulaması yaptıktan sonra tomurcuklardan izole ettikleri anterleri farklı konsantrasyonlarda 2,4-D veya 2,4-D + BAP veya kinetin veya NAA+BAP veya kinetin ve 7 g agar içeren MS, B5 veya N6 ortamında kültüre almışlar ve kültürleri karanlık koşullarda 25 ℃'ye yerleştirmişlerdir. Araştırma sonuçları, kallus indüksiyonu için besi ortamına yalnız başına oksin ilavesi yerine oksin + sitokinin ilavesinin daha uygun olduğunu, anterlerden kallus oluşum frekansının genotiplere, ortam kombinasyonlarına ve genotip x ortam kombinasyonu interaksiyonlarına bağlı olarak değiştiğini göstermiştir. En yüksek kallus indüksiyonu (% 80) çeşidin birinde B5+ 2 mg/l NAA + 2 mg/l BAP içeren ortamda elde edilmesine karşılık, bir diğer çeşitte ise B5+2mg/l NAA + 1 mg/l BAP ortamında gerçekleşmiştir. Krem renkli kalluslardan globular yapıda embriyoidler oluşmuştur. En yüksek embriyogenik kallus çeşidin birisinde B5 + 2 mg/l 2,4-D+ 2 mg/l BAP, bir diğer çeşitte ise B5+ 2 mg/l NAA + 2 mg/l BAP ortamında ortaya çıkmıştır. Kalluslar farklı konsantrasyonlarda BAP, kinetin ve IAA içeren B5, MS veya N6 ortamlarında ve

ışık koşullarında kültüre alınmıştır. Kalluslardan en yüksek sürgün rejenerasyonu (2.5 sürgün / kallus) B5 + 1 mg/l BAP + 0.5 mg/l kinetin + 0.5 mg/l IAA içeren ortamda gerçekleşmiştir. MS veya N6 ortamlarında kültüre alınan kalluslardan sürgün rejenerasyonu gerçekleşmemiştir.

Croser (2002), 15 nohut genotipi ile sürdürdüğü araştırmada, besi ortamının bileşiminin anterlerden kallus oluşumunu etkileyen en önemli faktör olduğunu, besi ortamı için optimum sakkaroz konsantrasyonunun 25.6 g (0.075 M) olduğunu, anterlerden kallus oluşumu için en önemli tetikleyicinin 2,4-D olduğunu, embriyojenik kalluslar 2,4-D içermeyen ortama aktarıldığında bazı genotiplerde kök ve bitki rejenerasyonu gerçekleştiğini, nohut anterlerinden 2,4-D içermeyen ortamlarda da kallus oluştuğunu, ancak bu kallusların somatik embriyo oluşturmadığını, büyüme düzenleyicisi içermeyen ortama gümüş nitrat ve gümüş thiosülfat gibi etilen oluşumunu engelleyici kimyasallar ve L-prolin ve L-serin gibi amino asitler ilave edildiğinde anterlerden kallus oluşumunun arttığını, anter kültürünün başarısını genotip ve donor bitkilerin yetişme koşullarının da etkilediğini, tomurcukların kültür öncesi 48 saat 4 °C'de tutulmasının anter reaksiyonunu olumlu etkilediğini, tomurcuklara santrifüj uygulaması, tomurcuk büyüklüğü ve anterlerin ortama yerleştirilme şeklinin anterlerden kallus oluşumunu etkilemediğini saptamıştır.

Vessal ve ark. (2002), iki İran nohut çeşidinde 7-10 gün soğuk uygulaması yaptıkları tomurcuklardan tek çekirdekli safhada mikrosporları içeren anterleri farklı 2,4-D (1-3 mg/l) ve kinetin (0.1-0.2,0.5 mg/l) konsantrasyonlarını içeren MS ortamında kültüre almışlardır. 2,4-D ve kinetin konsantrasyonlarının anterlerden kallus oluşumunu önemli derecede etkilediğini, konsantrasyon arttıkça kallus oluşumunun azaldığını ve en yüksek kallus indüksiyonunun 1 mg/l 2,4-D +0.2 mg/l kinetin içeren ortamda elde edildiğini, kallus oluşumunun genotip ve genotip x 2,4-D konsantrasyonu tarafından etkilendiğini, kallusların NAA, BA ve % 3 şeker içeren ortamda farklılaşma ve organogenesis gösterdiğini, 0.5 mg/l kinetin+ %10 şeker içeren Blaydes (1966) ortamında kalluslardan olgun embriyo elde edildiğini

bildirmişlerdir. Araştırıcılar anterlerden oluşan kalluslarda yaptıkları sitolojik araştırmada farklı ploidi düzeyindeki hücrelere rastlamışlardır. Araştırıcılar, nohut anter kültüründe başarı için farklı besi ortamları, besi ortamının büyüme düzenleyicisi çeşit ve konsantrasyonunun ve şeker konsantrasyonunun araştırılması gerektiği sonucuna varmışlardır.

Kennedy ve ark. (2002), 6 nohut çeşidi ve 1 *Cicer reticulatum* genotipinin 2-3 mm büyüklüğündeki tomurcuklardan izole edilen anterleri 2 mg/l 2,4-D+0.2 mg/l kinetin + B5 vitaminleri+ % 0.1 fitagel içeren MS ortamında kültüre almışlardır ve kültürleri 22 °C'de muhafaza etmişlerdir. Genotiplere bağlı olarak anter reaksiyon oranı % 27.2 ile % 93.5 arasında değişmiştir. Kalluslarda daha sonra embriyo benzeri yapılar oluşumu gerçekleşmiştir.

Grewal ve ark. (2009), birisi Kanada orijinli ve kabuli tipi diğeri Avustralya orijinli ve desi tipi iki nohut çeşidinin anterlerin içinde bulunduğu tomurcuklara 4 gün 4 °C'de soğuk uygulaması, anterlere elektrik şoku uygulama, santrifüj uygulama ve yüksek osmotik basınçlı ortamda 4 gün kültür gibi farklı stres uygulamaları yaptıktan sonra kendi oluşturdukları embiyo gelişme (EDM) ortamında 24 °C+2 °C'de kültüre almışlardır. Kültür ortamında Kanada orijinli çeşidin anterleri maksimum % 63, Avustralya orijinli çeşidin anterleri ise % 69 reaksiyon göstermiş, kültür başlangıcından 15-20 gün sonra anter başına 2-2.3 embriyo oluşmuş, ayrıca bazı anterler küçük kalluslar oluşturmuştur. Kültür başlangıcından 15-20 gün sonra embriyolar ve kallus embriyo olgunlaşma ortamına (EMM) aktarılmıştır. Kotiledon safhasına erişen embriyolar rejenerasyon ortamına aktarılmış ve 23 °C'de ışıklı ortama yerleştirilmiştir. Bu ortamda rejenere olan bitkicikler 1 ay sonra sera ortamına aktarılmıştır. 10-30 günlük kalluslarda yapılan mikroskobik kromozom sayımlarda farklı ploidi düzeyine sahip hücrelere rastlanmıştır. Kallus, embriyo ve rejenere olan bitkiciklerde yapılan flow cytometri analizinde bitkilerin haploid orijinli oldukları, ancak in vitro koşullarda rejenerasyonun erken dönemlerinde kromozom katlaması ortaya çıktığı saptanmıştır.

Croser ve ark. (2011), 3 nohut çeşidinin 2,8-3.5 mm boyutlarındaki tomurcuklardan izole ettikleri anterlerden mikrospor izole etmişler ve mikrosporları 11 farklı ortamda kültüre almışlardır. Tomurcuklar anter izolasyonu öncesi 24-48 saat 4 ℃'de tutulmuştur. Kış döneminde ve ilkbahar döneminde yetiştirilen bitkilerden elde edilen tomurcuklara soğuk uygulaması mikrospor reaksiyonunu olumlu etkilemiş, yaz öneminde yetiştirilen bitkilerden alınan tomurcuklara soğuk uygulaması ise mikrospor reaksiyonunda önemli değişime neden olmamıştır. Miksporlardan pro embriyolar elde edilmiş, ancak bu embriyolar bitkiye dönüşmemiştir.

Lulsdorf ve ark. (2012), bir nohut genotipinin 2-3 mm, 2 bezelye genotipinin 5-6 mm boyutlarındaki tomurcukları ve 1 mercimek genotipinin 1.5 -2 mm boyutlarındaki tomurcuklarına 4 ^{o}C'de soğuk uygulaması yapıldıktan sonra izole ettikleri anterlere osmotik şok, elektrik şoku, sanikasyon, santrifüj uygulaması gibi değişik stres uygulamaları yapmışlar ve kültüre almışlardır. Osmotik şok uygulamasının nohut anterlerinde bir IAA metaboliti olan IAA-asparagin metaboliti konsantrasyonunun arttığının saptandığını ve IAA'nın anterlerden haploid kallus/embriyoid uyartımında anahtar rol oynadığı sonucuna varıldığını bildirmektedirler.

Panchangam ve ark. (2014), dört nohut genotipi ile yürüttükleri araştırmada 2-3 mm uzunluğundaki anterleri 2-4 gün 4 ^{o}C'de tuttuktan sonra yüksek osmotik basınç ve santrifüj uygulaması gibi stres uygulaması yapmışlar ve farklı ortamlarda kültüre almışlardır. 4 °C'de 4 gün soğuk uygulaması anter reaksiyon oranını olumlu etkilemiş, santrifüj uygulamalarının anter reaksiyonuna etkisi olmamıştır. Araştırmada mikrokalluslar oluşmuş, ancak bitki rejenerasyonu gerçekleşmemiştir.

Abdollahi ve Rashidi (2018), iki farklı nohut çeşidinin 3 mm uzunluğundaki tomurcuklarından izole ettiği anterleri Grewal ve ark., (2009), tarafından kullanılan EDM ortamına farklı konsantrasyonlarda (0,2,5, 10 mg/l) 2,4-D ve farklı konsantrasyonlarda (0,5,10,15,25,50 mg/l) gümüş nitrat içeren ortamlarda kültüre almıştır. Genotipin birisinde 10 mg/l 2,4-D ve 15 mg/l gümüş nitrat içeren ortamda

en yüksek anter başına embriyo sayısı (0.188) ve anter başına rejenere olan bitki sayısı (0.1) elde edilirken, diğer genotip 10 mg/l 2,4-D ve 15 veya 50 mg/l gümüş nitrat içeren ortamda en yüksek anter başına embriyo sayısı (0.1) ve rejenere olan bitki sayısı (0.075) elde edilmiştir. Araştırmacılar başka bir denemede ise, tomurcukları farklı sürelerle (0,4 veya 7 gün) 4°C'de tuttuktan sonra bu tomurcuklardan izole edilen anterleri 10 gün 30 °C'de, 2 gün 32 °C'de veya 8 gün 35 °C'de tuttuktan sonra 25 °C'de kültür devam etme uygulamalarının etkisini araştırmışlar ve sıcaklık uygulamasına bağlı olarak anter reaksiyon oranının 3.3 ile 43.3 arasında değiştiğini ve en yüksek anter reaksiyon oranını % 43.3 ile 4 °C'de 4 gün soğuk uygulaması + 32 °C'de 2 gün kültür uygulamasından, en yüksek anter başına embriyo sayısının 32 °C'de 2 gün kültür uygulamasından ve en yüksek anter başına rejenere bitki sayısının (0.0332) 4 °C'de 7 gün soğuk uygulaması + 30° C'de 10 gün kültür uygulamasından elde edildiğini bildirmişlerdir.

Rashidi ve ark. (2019), bir nohut çeşidinin tek çekirdekli aşamadaki mikrosporlarını içeren 3 mm uzunluğundaki tomurcuklardan izole edilmiş 1 mm uzunluğundaki anterleri farklı santrifüj uygulamalarına (150g, 300g ve 600g ve 3, 6 ve 10 dakika) maruz bırakılmış ve/veya farklı elektrik şok uygulamaları (0, 100, 150 ve 200V) yapılmıştır. İşlem gören anterler daha sonra kallus ve embriyoları indüklemek için 10 mg / l 2, 4-D ve 10 mg / l gümüş nitrat içeren EDM ortamında kültür edilmiştir. Anter reaksiyon oranı ve bitki rejenerasyonu açısından farklı santrifüj seviyeleri, farklı elektrik şok seviyeleri ve bunların kombinasyonları arasında önemli farklılıklar saptanmıştır.

Özer (2020), 11 nohut F2 popülasyonu ve 4 nohut çeşidi (Gökçe, Uzunlu99, Er99 ve Dikbaş) ile sürdürdüğü araştırmada, donör bitkileri açık arazi koşullarında ve sera koşullarında yetiştirmiştir. Hasat edilen tomurcuklara 4°C'de 4 gün veya 7 gün soğuk uygulaması yapmıştır. Anterleri farklı büyüme düzenleyicisi kombinasyonlarını içeren 5 farklı EDM ortamında kültüre almıştır. Kültür gelişen kallusları yine farklı büyüme düzenleyicisi kombinasyonlarını içeren EMM ortamında kültüre almıştır. EMM ortamındaki embiyogenik kallusları yine farklı

konsantrasyonlarda büyüme düzenleyici kombinasyonları içeren rejenerasyon ortamına aktarmıştır. Oluşan sürgünler 0.25 mg/l veya 0.5 mg/l IAA, IBA veya NAA içeren köklendirme ortamında kültüre almıştır. Araştırıcı, anterlerin kültüründen 15 gün sonra anterlerde uzama ve şişme, 1 ay sonra ise embriyogenik kallus oluşumu gerçekleştiğini gözlemiştir. Anterlerin kallus oluşturma, oluşan kallusların rejenerasyonu genotiplere, ortamlara ve bunların kombinasyonlarına bağlı olarak önemli derecede değişmiştir. 4 °C 'de 4 gün soğuk uygulaması yapılan tomurcuklardan alınan anterler, 7 gün veya hiç soğuk uygulaması yapılmayanlara göre daha yüksek reaksiyon göstermiştir. Arazi koşullarda yetişen donor bitkilerden alınan anterler sera koşullarında yetişenlere göre daha iyi reaksiyon göstermiştir. En yüksek embiyogenik kallus sayısı 2.68 adet ile 10 mg/l 2,4-D+0.1 mg/l TDZ+15 mg/l gümüş nitrat içeren ortamda elde edilmiştir. En yüksek sürgün rejenerasyon 1 mg/l BAP+0.03 mg/l NAA içeren ortamda elde edilmiştir. Test edilen köklendirme ortamlarının hiç birisinde sürgünler köklenmemiştir. Sürgünlerde yapılan ploidi araştırmasında sürgünlerin çok azının haploid olduğu, çoğunluğunun diploid olduğu saptanmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Araştırmada Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen Türkiye'de yetiştiriciliği yapılan 5 adet nohut çeşidinin (Seçkin, Sezgin, İnci, Hasanbey ve Onur) tohumları materyal olarak kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Donör Bitkilerin Yetişme Koşulları

Ç.Ü Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümünde 5 nohut genotipine ait tohumlar 15 Ekim, 1 Kasım ve 15 Kasım tarihlerinde olmak üzere üç farklı ekim zamanında saksılara ve 15 Kasım tarihinde her genotip 45 cm aralıklı 5 m uzunluğundaki 2 sıraya 10 cm sıra üzeri mesafesi olacak şekilde arazi koşullarında ekilmiştir.

Her ekim tarihinde her bir genotipe ait tohumlar toprak harcı (2 tarla toprağı + 1 kum+ 1 çiftlik gübresi) ile doldurulmuş ve açık hava koşullarına yerleştirilmiş olan 14×14×14 cm boyundaki 5 saksıya her saksıda 6 tohum olacak şekilde ekilmiştir. Tohumlar çimlendikten sonra (Şekil 3.1), fideleri kuş zararına karşı korumak için saksıların üzerine file çekilmiştir (Şekil 3.2). Bitkiler yeterince geliştikten sonra her saksıda 3 bitki olacak şekilde seyreltme yapılmıştır (Şekil 3.3). Saksılar düzenli olarak sulanmıştır.



Şekil 3.1. Saksılarda çıkış yapmış nohut fideleri



Şekil 3.2. Üzerine file çekilmiş nohut fideleri



Şekil 3.3. Her birinde 3 nohut fidesi bulunan saksılar

Arazi koşullarında ekimde, ekim öncesi parsellere 1.8 kg/da azot ve 4.6 kg/da fosfor olacak şekilde 10 kg/da diamonyum fosfat olacak şekilde taban gübresi uygulandıktan sonra 45 cm sıra aralığı ile açılan 5 m uzunluğundaki sıralara 10 cm sıra üzeri mesafesi ile her genotip 2 sıra halinde ekilmiştir. Bitkiler çıktıktan sonra (Şekil 3.4) gerektikçe çapalama yapılmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.4. Tarla koşullarında çıkış yapan nohut fideleri



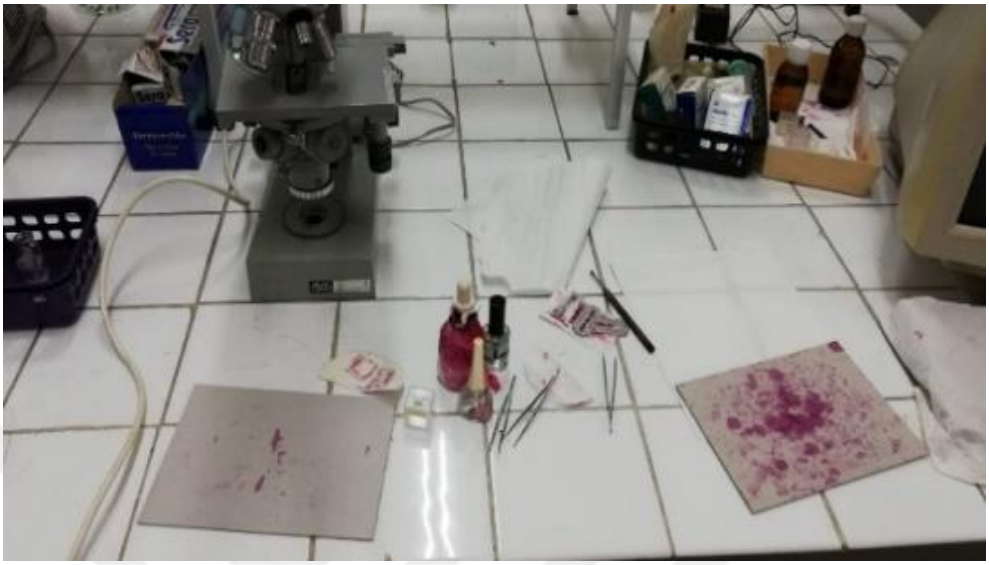
Şekil 3.5. Tarla koşullarında donör nohut bitkileri

3.2.2. Donör Bitkilerden Tomurcukların Hasadı

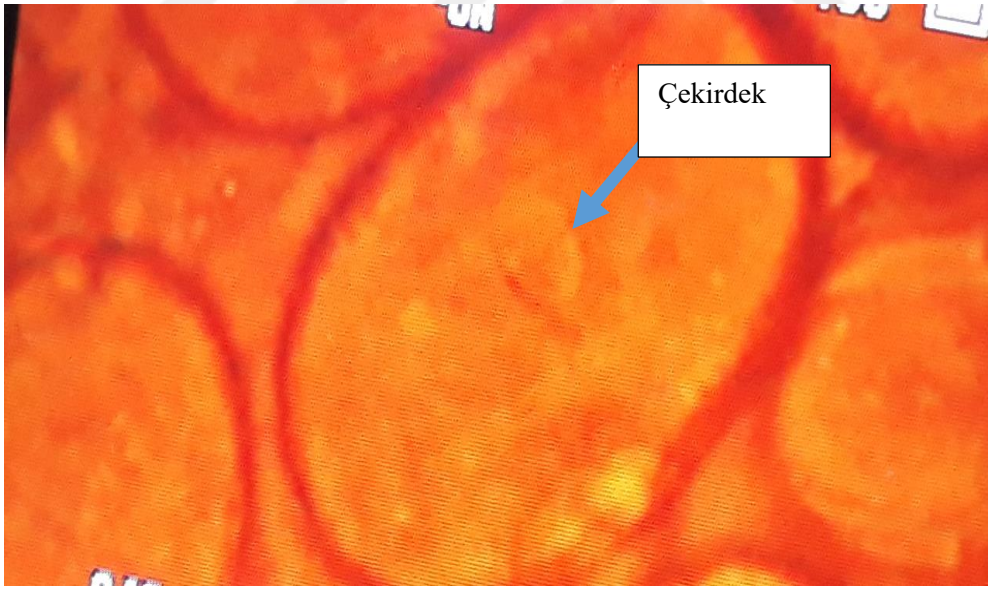
Anter kültürü çalışmalarında reaksiyon oranını etkileyen en önemli faktörlerden birisi de donör bitkinin hasat edildiği dönemdeki mikrospor gelişim safhasıdır ve bunun kültüre alma işlemi öncesinde sitolojik inceleme ile tespit edilmiş olması gerekir (Grewal ve ark., 20009). Sitolojik inceleme için farklı boyutlardaki tomurcuklardan alınan anterler (Şekil 3.6) bir lam üzerine yerleştirilmiş ve lam üzerine bir damla asetokarmin damlatılmıştır. Anterler lam üzerinde hafif parçalandıktan sonra lam üzerine lamel kapatılarak hazırlanan preparat (Şekil 3.7) mikroskop altında incelenmiştir. Yapılan sitolojik incelemede orta veya geç tek çekirdekli dönemde mikrosporlara (Şekil 3.8) sahip anterleri içeren tomurcuklar alınmıştır. Yapılan mikroskobik inceleme sonucu 2-3 mm uzunluğundaki tomurcukların (Şekil 3.9 ve Şekil 3.10) uygun safhadaki mikrosporlara sahip anterleri içerdiği saptanmış ve donör bitkilerden söz konusu boyuttaki tomurcuklar anter kültürü için hasat edilmiştir.



Şekil 3.6. Nohut Anterleri



Şekil 3.7. Nohut anterlerinden mikrospor safha incelemesi için preparat hazırlama



Şekil 3.8. Tek çekirdekli safhada nohut mikrosporu



Şekil 3.9. Anter kültürü için uygun boyuttaki nohut tomurcuğu



Şekil 3.10. Tarla koşullarında uygun boyutta tomurcukları içeren nohut bitkileri

3.2.3. Soğuk Ön Muamelesi

Uygun mikrospor safhasındaki anterleri içeren tomurcuklar donör bitkilerden toplanmış ve daha sonra tomurcuklar içinde nemlendirilmiş filtre kağıtları bulunan 90 mm çapındaki plastik petri kapları içinde +4 ^{o}C'de 7 gün süreli soğuk uygulamasına tabi tutulmak üzere buzdolabına yerleştirilmiştir.

3.2.4. Deneme Planı

Araştırmada, 5 nohut genotipinden alınan anterler iki farklı oksinin farklı konsantrasyonlarının (5 veya 10 mg /l 2,4-D, 1 veya 2 mg/l Picloram) iki farklı sitokininin farklı konsantrasyonları (0 ve 0.5 mg/l Kinetin veya BAP) ile kombinasyonlarını içeren ve Çizelge 3.1'de bileşimi verilen indüksiyon ortamlarında kültüre alınmıştır. Araştırma tesadüf bloklarında bölünen bölünmüş parseller deneme desenine göre düzenlenmiştir. Ana parselleri genotipler, alt parselleri oksin çeşit ve dozu, alt-alt parselleri ise sitokinin çeşit ve dozu oluşturulmuştur. Araştırmada, içerisinde 30 adet anter kültür edilen 60 X 15 mm boyutlarındaki petri kutusu bir deneme ünitesi olarak kabul edilmiştir. Araştırmada, her bir muamele kombinasyonu 5 kez tekrarlanmıştır.

3.2.5.Kullanılan Besi Ortamı ve Besi Ortamının Hazırlanması

Araştırmada anter kültürünün farklı aşamalarında temel besi ortamı olarak Grewal ve ark. (2009) tarafından geliştirilen Embriyo Geliştirme Ortamı (EDM), Embriyo Olgunlaştırma Ortamı (EMM) ve Bitki Rejenerasyon Ortamı (PRM) olmak üzere üç farklı temel besi ortamı kullanılmıştır. Bu ortamlarının bileşimi Çizelge 3.1'de gösterilmiştir. Araştırmada kullanılan besi ortamlarının birim hacimlerinde bulunması gerekli birçok maddenin miktarları oldukça düşüktür. Bu maddelerin her defasında teker teker tartılarak hazırlanması büyük zaman kaybına neden olacağından besi ortamlarını oluşturan ögelerin stok solüsyonları hazırlanmıştır (Hatipoğlu, 2008).

3.2.5.1.Makro ve Mikro Elementlerin Stok Solüsyonlarının Hazırlanması

Her bir besi ortamında bulunması gerekli olan $CoCl_2$ $6H_2O$, $CuSO_4$ $2H_2O$, Na_2MoO_4 $2H_2O$ gibi mikro elementler ve Demir Jelatı ($FeSO_4$ $7H_2O$ Na_2EDTA) dışındaki makro ve mikro elementlerin her biri besi ortamında litrede bulunması gerekli olan miktarlarının 5 katı hassas terazide tartıldıktan sonra, içerisinde 200 cc bidestile su bulunan ve bir magnetik karıştırıcı üzerine yerleştirilmiş olan 500 ml'lik bir beher kabına sırasıyla ilave edilmişlerdir.

Karışımı oluşturan elementler iyice çözündükten sonra, karışımın hacmi 500 ml'ye tamamlanmış ve her biri 100 ml olan 5 ayrı plastik stok kabına 100'er ml paylaştırılmıştır. Kapların üzerine yapıştırılan etiketlere besi ortamının adı içerdiği makro-mikro elementler ve ortamın yapılış tarihi yazılarak buzdolabının derin dondurucusunda muhafaza edilmiştir. $CoCl_2$ $6H_2O$, $CuSO_4$ $2H_2O$ ve Na_2MoO_4 $2H_2O$ bileşenlerinin ise ayrı ayrı stok solüsyonları hazırlanmıştır.

3.2.5.2. Jelat ($FeSO_4$ $7H_2O$ ve Na_2EDTA) Hazırlanması

1.815 gr Na_2EDTA bir magnetik karıştırıcı üzerine yerleştirilmiş 250 ml'lik beher kabında 200 cc bidestile su içinde eritilmiş ve eriyik 90^oC'ye kadar ısıtılmıştır. Sıcaklık belirtilen düzeye eriştiğinde çözeltiye 1.3925 gr $FeSO_4$ ilave edilmiş ve iyice karıştırılmıştır. Daha sonra karışım oda sıcaklığına erişinceye kadar soğutulmuş ve hacmi 250 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan jelat koyu renkli veya alimünyum kağıtla sarılmış pyrex şişe içinde oda şartlarında muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.1 Araştırmada Kullanılan Besi Ortamları

Bileşen (mg/l)	EDM	EMM	PRM
NH4NO3	1 000.00	1,000.00	1,650.00
KNO3	2 100.00	2,100.00	1,900.00
KH2PO4	325.00	325.00	170.00
NaH2PO4_H2O	85.00	85.00	–
CaCl2_2H2O	600.00	600.00	440.00
MgSO4_7H2O	435.00	435.00	370.00
FeSO4_7H2O EDTA	25.00	25.00	27.85
H3BO3	5.00	5.00	6.20
KI	1.00	1.00	0.83
MnSO4_H2O	15.00	15.00	22.30
ZnSO4_7H2O	5.00	5.00	8.60
CuSO4_5H2O	0.10	0.10	0.03
NaMoO4_2H2O	0.40	0.40	0.25
CoCl2_6H2O	0.10	0.10	0.03
Thiamine HCL	2.00	2.00	10.00
Pyridoxine HCL	0.50	0.50	1.00
Nicotinic acid	–	–	1.00
Myo-inositol	250.00	250.00	100.00
Calcium pantothenate	1.00	1.00	1.00
Biotin	0.10	0.10	–
Casein hydrolysate	300.00	300.00	–
Coconut water (ml)	20.00	20.00	–
GA3	–	5.00	–
IAA	–	4.00	–
ABA	–	1.00	–
BAP	–	–	0.10
NAA	–	–	0.01
Agar (%)	1.20	1.20	0.60
Sucrose	40 000.00	40 000.00	35 000.00
Maltose	40 000.00	40 000.00	35 000.00
pH	5.80	5.80	5.80

Kaynak: Grewal ve ark. 2009

3.2.5.3.Vitamin Stok Solüsyonlarının Hazırlanması

Besi ortamında bulunan Thiamine HCL 100 mg, Pyridoxine HCL 100 mg, Nicotinic acid 100 mg, Biotin, 10 mg ve Calcium pantothenate 50 mg olacak şekilde her biri hassas terazide tartılarak 150 cc'lik beherler içinde 20-30 ml bidestile suda çözüldükten sonra hacim 100 ml'ye tamamlanmış ve pyrex cam şişe içinde buzdolabında muhafaza edilmiştir. Myo-inositol ve Casein hydrolysate 'nın stok solüsyonu hazırlanmamış, ortam hazırlanırken gerekli miktar (250 mg Myo-inositol ve 300 mg Casein hydrolysate) tartılarak ilave edilmiştir.

3.2.5.4. Büyüme Düzenleyicilerinin Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

Besi ortamları kombinasyonlarında bulunan 2,4-D (2,4 Diklorofenoksiasetik asit)'nin 25 mg/ 100 ml , NAA (α-Naftalen Asetik Asit)'nın 10 mg/50 ml, IAA (Indol-3-Asetik Asit)'nın 25 mg/ 100 ml ve Picloram'ın 25 mg/100 ml,, kinetinin 10 mg/ 50 ml ve BAP (6-Benzil Amino Purin)'ın 10 mg/ 50 ml , GA3 (Gibberellik Asit)'ün 25 mg/100 ml, ABA (Absizik Asit)'in 20 mg/50 ml olacak şekilde her biri , hassas terazide tartılarak vitaminlerin stok çözeltisi gibi hazırlanmıştır. Ancak tartılan belirli miktarlardaki büyüme düzenleyicilerin üzerine önce birkaç damla KOH damlatılarak eritildikten sonra 100 ml'lik beher içine boşaltılmış ve üzerine bir miktar bidestile su ilave edildikten sonra çözelti'nin sıcaklığı 50 °C'yi geçmeyecek şekilde magnet karıştırıcı üzerinde ısıtılmıştır. Büyüme düzenleyicisi iyice çözündükten sonra oda sıcaklığına erişinceye kadar soğutulmuş ve daha sonra bidestile su ile çözeltinin son hacmine tamamlanmıştır. Çözeltiler pyrex şişe içinde buzdolabında muhafaza edilmiştir.

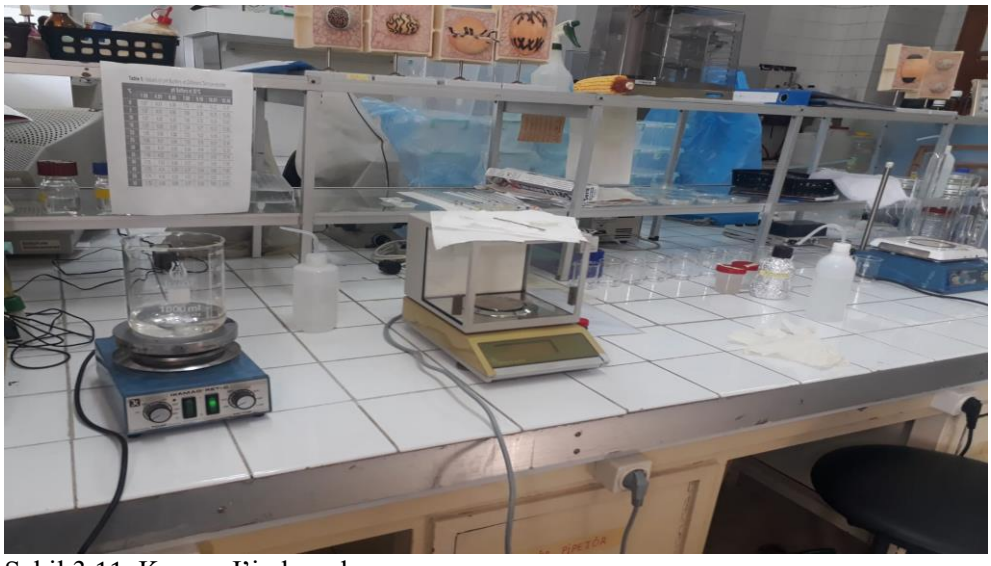
3.2.5.5.Stok Solüsyonlarından Yararlanarak Besi Ortamının Hazırlanması

Araştırmada kullanılan besi ortamlarının hazırlanması için aşağıdaki yöntem izlenmiştir.

Karışım I

Besi ortamı kombinasyon sayısının (16 kombinasyon) fazla olması dolayısıyla herbir oksin çeşidi (2,4-D ve Picloram) içeren besi ortamları ayrı ayrı hazırlanmıştır. Her bir besi ortamı için daha önceden hazırlanmış olan 100 ml'lik makro ve mikro element stok solüsyonları magnetik karıştırıcı üzerinde bulunan 1 litrelik pyrex beher içerisine boşaltılarak, iyice karıştırılmış ve karışıma stok solüsyonunda bulunmayan mikro elementlerin gerekli miktarları stok solüsyonlarından ilave edilmiştir (Şekil 3.11). Karışımın hacmi bidestile su ile 800 ml 'ye tamamlanmış ve önceden kalibrasyonu yapılmış olan pH metrede 1 N KOH ve 1 N HCL çözeltilerinin yardımıyla 5.8 pH ölçüsüne getirilmiştir. Karışım toplam kombinasyonun yarısı olan 8 eşit parçaya ayrılarak 250 ml'lik erlenmayer şişelerine boşaltılmıştır. Her bir varyant içerisine 1.5 gr agar ilave edilmiştir ve şişelerin ağızları alüminyum kağıtla sarılmıştır. İçinde karışım I bulunan erlenmayer kapları kaynama sıcaklığına gelmeyecek şekilde ısıtıldıktan sonra otoklavda 121^{o}C sıcaklık ve 2 bar basınç altında 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir.

Aynı işlemler diğer oksin çeşidi için de tekrarlanmıştır.



Şekil 3.11. Karşım I'in hazırlanması

Karışım II

Manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilmiş olan bir 250 ml'lik beher içerisine 50 ml bidestile su ilave edilmiş ve içerisine 40 gr Maltoz ve 40 gr Sakkaroz eklenmiştir. Şeker iyice çözündükten sonra çözeltiye 250 mg Myo-inositol, 300 mg Casein hydrolsyate ve 20 ml Hindistan cevizi sütü ilave edilmiştir. Daha sonra çözeltiye 2 mg Thiamin HCL, 0.5 mg, Pyridoxine HCL, 2 mg Calsiyum pantothenate, 1 mg Biotin ilave edilmiş ve çözeltinin son hacmi bidestile su ile 160 ml ye tamamlanmıştır (Şekil 3.12). Karışım 8 eşit parçaya bölünmüştür. Herbir bir karışım 2 varyantına gerekli miktarda 2,4-D ile birlikte BAP veya Kinetin ilave edilmiş ve her bir karışım 2 varyantının son hacmi bidestile su ile 25 ml'ye tamamlanmıştır. Her bir varyantın pH'sı ayrı ayrı 5.8'e ayarlanmıştır (Şekil 3.13). Karışım II varyantları steril kabin içerisinde, ucunda 0.2 µ delik çapına sahip steril filtre takılı 50 ml'lik plastik şırınga ile steril pyrex şişeler içerisine filtre edilmiştir (Şekil 3.14).

Otoklavdan çıkarılan Karışım I steril kabin içinde bulunan bir magnetik karıştırıcı üzerine yerleştirilmiş ve karışımın sıcaklığı 40-50 ^{o}C civarına geldiğinde Karışım II, Karışım I üzerine ilave edilmiş ve iyice karıştırılmıştır. Hazır hale gelen besi ortamı varyantları, kabin içerisinde ucunda steril pipet bulunan bir pipet pompası yardımıyla, 60 x 15 mm boyutlarındaki petrilere 7'şer ml boşaltılmıştır (Şekil 3.15). Kültür kapları içindeki besi ortamının sıcaklığı oda sıcaklığına düşüp katılaştığında, kültür kapları plastik muhafaza kutuları içine yerleştirilmiş (Şekil 3.16) ve en erken 24 saat sonra kullanılmak üzere 10 ^{o}C karanlıkta muhafaza edilmiştir.



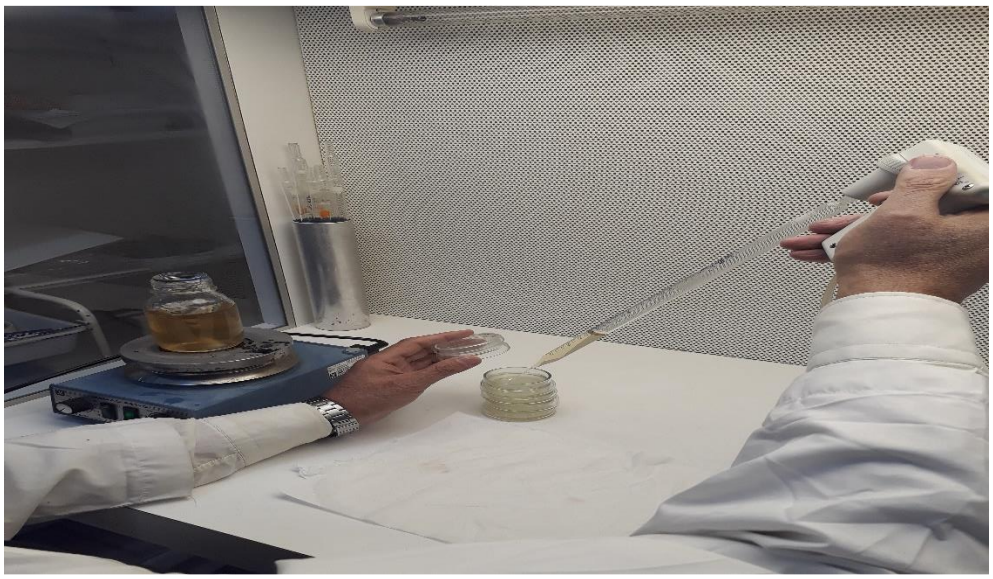
Şekil 3.12. Hazırlanmış karışım II çözeltisi



Şekil 3.13. Karşım II varyantlarında pH ayarlanması



Şekil 3.14. Karşım II varyantlarının steril filtreden geçirilmesi



Şekil 3.15. Besi ortamı varyantlarının petri kaplarına boşaltılması



Şekil 3.16. İçinde besi ortamı bulunan petri kaplarının plastik muhafaza kaplarına yerleştirilmesi

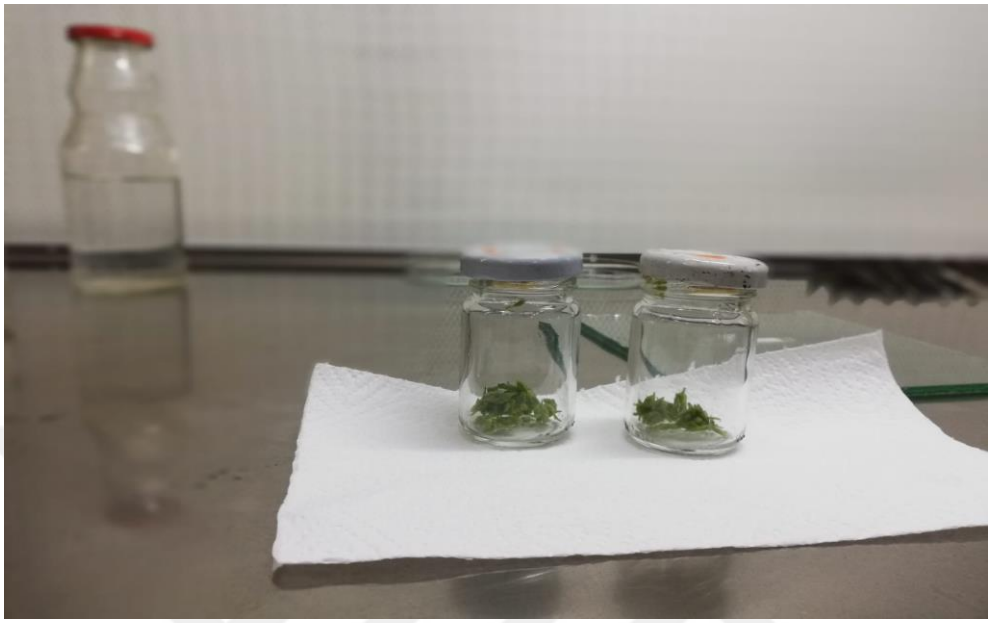
3.2.6. Tomurcukların Sterilizasyonu ve Anterlerin Besi Ortamına Yerleştirilmesi

Soğuk uygulama süresi tamamlanan tomurcuklar, ağzı kapaklı cam şişelere aktarılmış ve çeşme suyu ile çalkalandıktan sonra, steril kabin içerisinde önce % 70'lık alkol ile 30-40 saniye süre ile çalkalanmış daha sonra yüzey gerilimini azaltmak için içine birkaç damla Tween 20 ilave edilmiş olan % 5 sodyum hypoklorit içeren % 50'lik hipo çözeltisinde 10 dakika süre ile çalkalanarak sterilize edilmiştir (Şekil 3.17). Bu işlemlerden sonra tomurcuklar en az 4 kez steril destile su ile yıkanmış (Şekil 3.18) ve şişelerdeki tomurcuklar içerisinde steril su ile nemlendirilmiş steril filtre kağıdı bulunan steril petri kapları içine boşaltılmıştır.

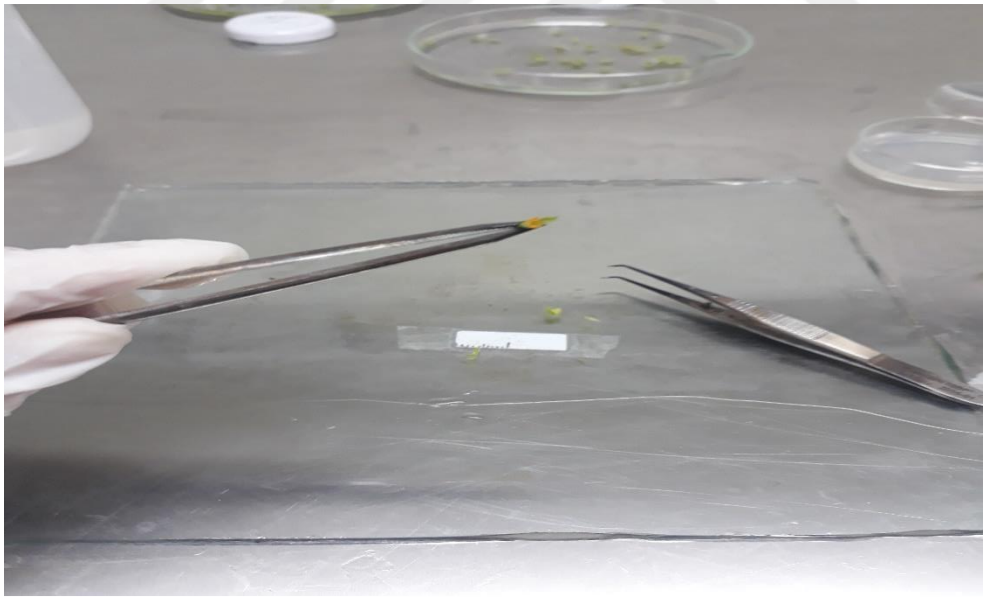
Sterilize edilen tomurcuklardan çıkartılan anterler (Şekil 3.19) steril pensler yardımıyla çıkarılmış ve içerisinde farklı büyüme düzenleyicisi kombinasyonlarını içeren 7 ml indüksiyon ortamı bulunan steril cam petrilerin (60 x 15 mm) içine 30'şar tane olacak şekilde yerleştirilmiştir (Şekil 3.20). Petrilerin etrafı parafilmle sarılmış ve üzerine genotip, besi ortamı kombinasyonu ve kültüre alma tarihi yazılmıştır (Şekil 3.20).



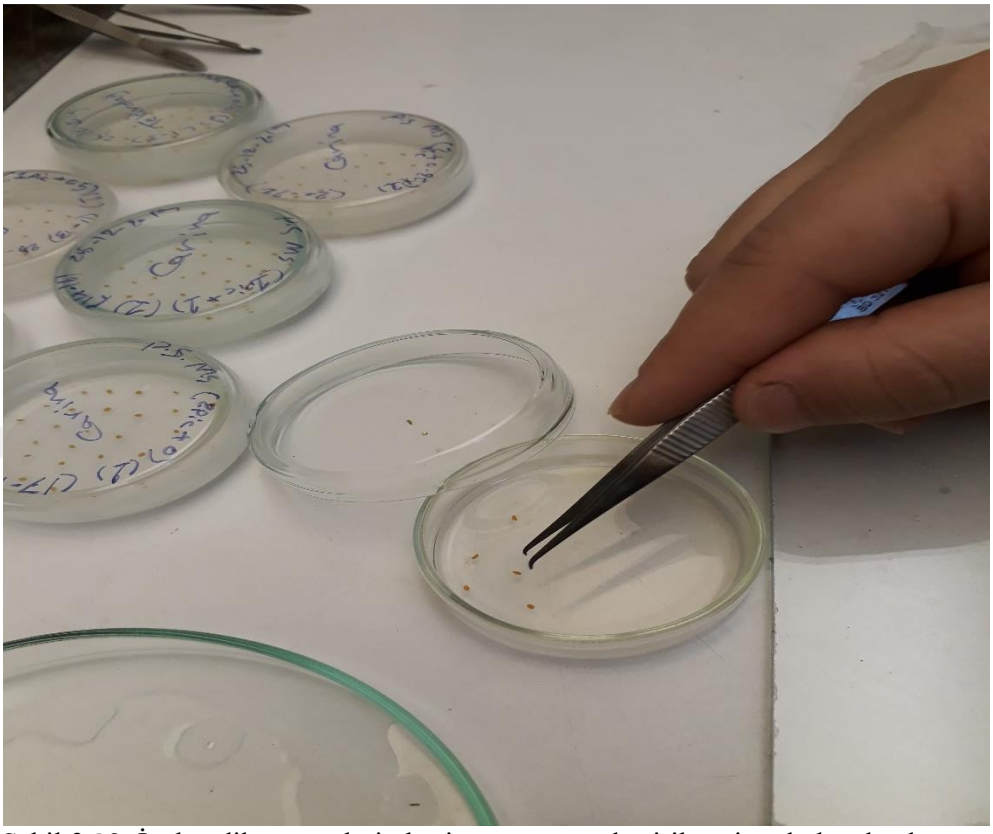
Şekil 3.17. Tomurcukların sterilize edilmesi



Şekil 3.18. Steril hale getirilmiş tomurcuklar



Şekil 3.19. Tomurcuklardan anterlerin izole edilmesi



Şekil 3.20. İzole edilen anterlerin besi ortamına yerleştirilmesi ve kültür kaplarının etiketlenmesi

3.2.7. Anterlerden Embriyoid Oluşumu

Kültür ortamına yerleştirilen anterler 25 °C sıcaklık ve % 70 oransal nem koşullarının sağlandığı Nüve Marka ID 500 model iklim dolaplarında inkübe edilmiştir. Anterlerden embriyoid ve/veya kalluslar oluştuktan sonra her petri kutusunda embriyoid ve /veya kallus oluşturan anterlerin (reaksiyon gösteren anterler) sayısı saptanmıştır. Daha sonra bu değerler 100 anter başına reaksiyon gösteren anter sayısı olarak hesaplanmıştır.

3.2.8. Bitki Rejenerasyonu

İndüksiyon süresi sonunda oluşan embriyoidler ve kalluslar embriyo olgunlaşma ortamına aktarılmıştır. Embriyo olgunlaşma ortamı olarak (Grewal ve ark. 2009) tarafından önerilen ortam (Çizelge 3.1) kullanılmıştır. Embriyo olgunlaşma ortamına aktarılan embriyolar 25 °C sıcaklık ve % 70 nem koşullarında muhafaza edilmiştir.

Kotiledon aşamasına gelen embriyolar Grewal ve ark. (2009) tarafından önerilen rejenerasyon ortamına (Çizelge 3.1) aktarılmış ve kültürler 25 °C sıcaklık ve % 70 nem, 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık koşulların sağlandığı iklim dolaplarına yerleştirilmiştir.

3.2.9. Denemeden Elde Edilen Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

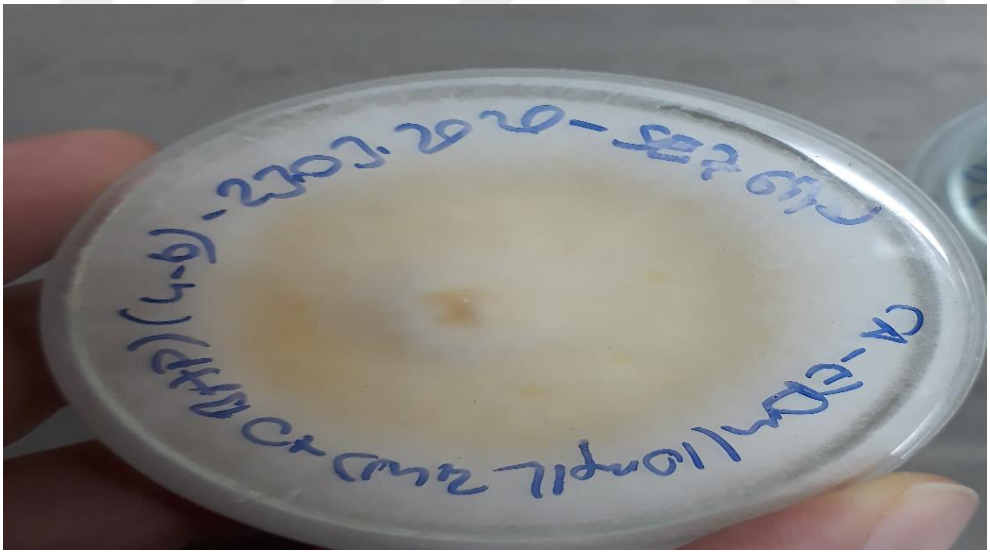
Denemeden elde edilen verilere tesadüf bloklarında bölünen bölünmüş parseller deneme desenine uygun olarak MSTATC istatistiksel paket programında varyans analizi uygulanmıştır. Denemede oransal olarak ifade edilen verilere varyans analiz uygulanmadan önce Arcsin $\sqrt{x+0.001}$ transformasyonu uygulanmıştır. İstatistiksel olarak önemli çıkan özellik ortalamaları Duncan testi ile karşılaştırılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Kültürlerde Enfeksiyon Oranı

Kültür başlangıcından 3 gün sonra kültürlerde enfeksiyon kontrolü yapılmıştır. Araştırmanın başlangıcında yüksek enfeksiyon oranı ortaya çıkmıştır. Başlangıçta tomurcukların çok küçük olması nedeniyle çelik süzgeçler içerisine yerleştirilen tomurcukların alüminyum kap içerisindeki % 20'lik hipo çözeltisi (% 1 sodyum hipoklorit içeren) içerisinde çalkalanması ile gerçekleştirilen sterilizasyon işleminin etkili olmadığı ve bu nedenle enfeksiyon oranının yüksek olabileceği düşünülmüştür. Daha sonraki sterilizasyon işlemleri, içerisinde % 50'lik hipo çözeltisi bulunan küçük şişeler içerisinde tomurcukların çalkalanması ile gerçekleştirilmiş ve enfeksiyon oranı önemli ölçüde düşmüştür.

Kültür kaplarında kültür başlangıcından 3. günden itibaren kültürlerde mantar (Şekil 4.1) veya bakteriyel enfeksiyonları (Şekil 4.2) gözlenmiştir. Bazı kültür kaplarında ise hem bakteri ve hem de mantar enfeksiyonu gözlenmiştir.



Şekil 4.1. Kültürlerde mantar enfeksiyonu



Şekil 4.2. Kültürlerde bakteri enfeksiyonu



Şekil 4.3. Kültürlerde bakteri ve mantar enfeksiyonu

Diğer taraftan, kültürlerde enfeksiyon kültür başlangıcında ortaya çıktığı gibi, kültürün daha geç aşamalarında, örneğin kültür başlangıcında 4-6 hafta sonra da gözlenmiştir. Bu durum bitki dokularındaki latent durumda bulunan mikroorganizmalardan kaynaklanmış olabilir (Herman, 2017). Leifert ve Cassesls (2001), in vitro koşullarda mikroorganizmaların çoğunlukla hemen faaliyete geçtiğini ve koloni oluşturduğunu, bazılarının ise uzun süre latent halde kaldıktan sonra koloni oluşturduğunu bildirmektedirler. Araştırıcılar, mantar ve mayaların in vitro koşullarda nadiren latent halde kaldıklarını bildirmektedirler. Singh (2018), in vitro kültürde kullanılan explantların yüzey sterilizasyonu ile ekplant yüzeyinde bulunan mikroorganizmaların (Epifitik) uzaklaştırıldığını, buna karşılık bitki dokularında bulunan mikroorganizmaların (Endofitik) yüzey sterilizasyonu ile uzaklaştırılmadığını açıklamıştır.

Araştırmanın başlangıcından itibaren içerisinde enfeksiyon görülen petri kapları deneme dışı bırakılmış ve her bir uygulama kombinasyonu için söz konusu deneme dışı bırakılan petri kaplarının sayısı kültür yapılan toplam petri kabı sayısına oranlanarak söz konusu uygulama kombinasyonu için enfeksiyon oranı hesaplanmıştır. Farklı uygulama kombinasyonları için saptanan enfeksiyon oranı değerleri Çizelge 4.1'de verilmiştir. Çizelgede izlendiği gibi, araştırmada, tüm uygulamaların ortalaması olarak saptanan enfeksiyon oranı %16.4 olarak gerçekleşmiştir. Yani anterlerin kültüre alındığı toplam 466 petri kabından 66'sında enfeksiyon ortaya çıkmıştır. Araştırmada ortaya çıkan yüksek enfeksiyon oranının, donor bitkilerin yetişme dönemi ve özellikle generatif gelişme döneminde havaların sıcak ve nemli geçmesi ile ilgili olabilir. Nitekim, bitkilerde bir mantari hastalık olan antraknoz hastalığı semptomları ortaya çıkmıştır. Söz konusu semptomlar fungusit uygulaması ile ortadan kalkmıştır. Diğer taraftan, saksılarda yetişen donör bitkilerden alınan tomurcuklardan kültüre alınan anterlerde tarla koşullarında yetişenlerden alınan tomurcuklardan izole edilenlere göre daha yüksek oranda

Çizelge 4.1 Farklı genotip-besi ortamı kombinasyolarında enfeksiyon oranları (%)

Genotip	Sitokinin	Kon mg/l	2,4-D			Picloram			Ort.
			5 mg/l	10 mg/l	Ort	1 mg/l	2 mg/l	Ort	
Seçkin	BAP	0	14.3	30.0	22.2	33.3	33.3	33.3	27.8
		0.5	12.5	33.3	22.9	44.4	30.0	37.2	30.1
		ort	13.4	31.7	22.6	38.9	31.7	35.3	29.0
	KİN	0	0	0	0	10.0	0	5.0	2.5
		0.5	18.2	0	9.1	22.2	20.0	21.1	15.1
		ort	9.1	0	4.6	16.1	10.0	13.1	8.9
	Ort		11.3	15.9	13.6	27.5	20.9	24.2	18.9
İnci	BAP	0	9.1	0	4.6	30.0	27.2	28.6	16.6
		0.5	10.0	10	10.0	9.1	18.2	13.7	11.9
		ort	9.6	5	7.3	19.6	22.7	21.2	14.3
	KİN	0	0	0	0	0	0	0	0
		0.5	10	9.1	9.6	10.0	9.1	9.6	9.6
		ort	5	4.6	4.8	5	4.6	4.8	4.8
	Ort		7.3	4.8	6.1	12.3	13.7	13.0	9.6
Onur	BAP	0	27.3	9.1	18.2	18.2	20.0	19.1	18.7
		0.5	27.3	27.3	27.3	36.4	9.1	22.8	25.1
		ort	27.3	18.2	22.8	27.3	14.6	21.0	21.9
	KİN	0	10.0	11.1	10.6	10.0	30.0	20.0	15.3
		0.5	0	22.2	11.1	10.0	20.0	15.0	13.1
		ort	5.0	16.7	10.9	10.0	25.0	17.5	14.2
	Ort		16.2	17.5	16.9	18.7	19.8	19.3	18.1
Sezgin	BAP	0	12.5	33.3	22.9	10.0	20.0	15.0	19.0
		0.5	11.1	30.0	20.6	9.1	30.0	19.6	20.1
		ort	11.8	31.7	21.8	9.6	25.0	17.3	19.6
	KİN	0	30.0	20.0	25.0	33.3	36.4	34.9	30.0
		0.5	20.0	36.4	28.2	8.3	20.0	14.2	21.2
		ort	25.0	28.2	26.6	20.8	28.2	24.6	25.6
	Ort		18.4	30.0	24.2	15.2	26.6	21.0	22.6
Hasanbey	BAP	0	20	0	10	18.2	0	9.1	9.6
		0.5	20	20	20	27.3	0	13.7	16.9
		ort	20	10	15	22.8	0	11.4	13.2
	KİN	0	18.2	16.7	17.5	0	10	5	11.3
		0.5	8.3	0	4.2	30	10	20	12.1
		ort	13.3	8.4	10.9	15.0	10	12.5	11.7
	Ort		16.7	9.2	13.0	18.9	5	12.0	12.5
Ortalama			14.0	15.5	14.8	18.5	17.2	17.9	16.4

0 mg/l BAP= % 18.3, 0.5 mg/l BAP= % 20.8; 0 mg/l Kin=% 11.8, 0.5 mg/l Kin= % 14.2

enfeksiyon ortaya çıkmıştır. Bu duruma neden olarak, saksılarda büyüyen bitkilerin tarla koşullarındakine göre daha sık bir bitki örtüsü oluşturması gösterilebilir.

Çölgeçen ve ark. (2011) bir tıbbi bitki olan *Arnebia densiflora* bitkisinin açık araziden alınan sürgün ucu ve kök eksplantlarında düşük sodium hipoklorit çözeltisinin % 100'e varan enfeksiyona neden olduğunu, yüksek konsantrasyonların ise enfeksiyonu azaltmakla beraber eksplantların ölümüne neden olduğunu, PPM ticari isimli bitki koruyucu maddenin konsantrasyona bağlı olarak sürgün enfeksiyonlarında %0-23.3, kök eksplantlarında %4.2 - %28.2 enfeksiyona yol açtığını, antibiyotik ile sterilizasyonda ise konsantrasyona bağlı olarak enfeksiyon oranının sürgün uçlarında %27-69, kök eksplantlarında ise %77-98 arasında değiştiğini hem PPM ve hemde antibiyotik ile sterilizasyonda yüksek konsantrasyonların eksplantlarda ölüme neden olduğunu saptamışlardır. Bu araştırmada hipo konsantrasyonunun %20'den %50'ye çıkartılması enfeksiyonda önemli azalmaya neden olmasına karşılık tomurcukların canlılığı üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Hesami ve ark. (2019), sera koşullarında yetiştirdikleri *Chrysanthemum* bitkilerinin yapraklarını farklı konsantrasyondaki sodyum hipoklorit çözeltisinde farklı sürelerle sterilize etmişlerdir. Araştırıcılar, % 2'lik sodium hipoklorit çözeltisinin yaprak eksplantlarında enfeksiyon oranını % 100'den %3'e düşürdüğünü ve sterilizasyon süresinin artması ile enfeksiyon oranının azaldığını saptamışlardır. Taghizadeh ve Solgi (2014), köpek dişi ayrığının stolon parçalarını farklı sterlizasyon çözeltileri ile sterilize ettiklerinde kültürlerdeki enfeksiyon oranı sterilizasyon yöntemine bağlı olarak % 22.2 ile % 46.7 arasında değiştiğini, %70'lik alkol ile kısa süreli sterilizasyondan sonra eksplantların % 30'luk Clorox (%3.6 sodyum hipoklorit içeren hipo) ile 15 dakika sterilize ettiklerinde enfeksiyon oranının %46.7 olduğunu saptamışlardır. Sayılan araştırmaların sonuçları bu araştırmada saptanan enfeksiyon oranlarının beklenebilecek oranlar olduğunu göstermektedir.

Wang ve ark. (2018), Temmuz, ve Ağustos aylarında hasat ettikleri *Iris sanguinea* tohumlarını %2'lik sodium hipoklorit çözeltisi ile 8-10 dakika muamele ettiklerinde enfeksiyon önemli azalma olduğunu, buna karşılık Eylül ayında hasat edilen tohumlarda aynı sterilizasyon işlemi sonucu %16.7 enfeksiyon ortaya

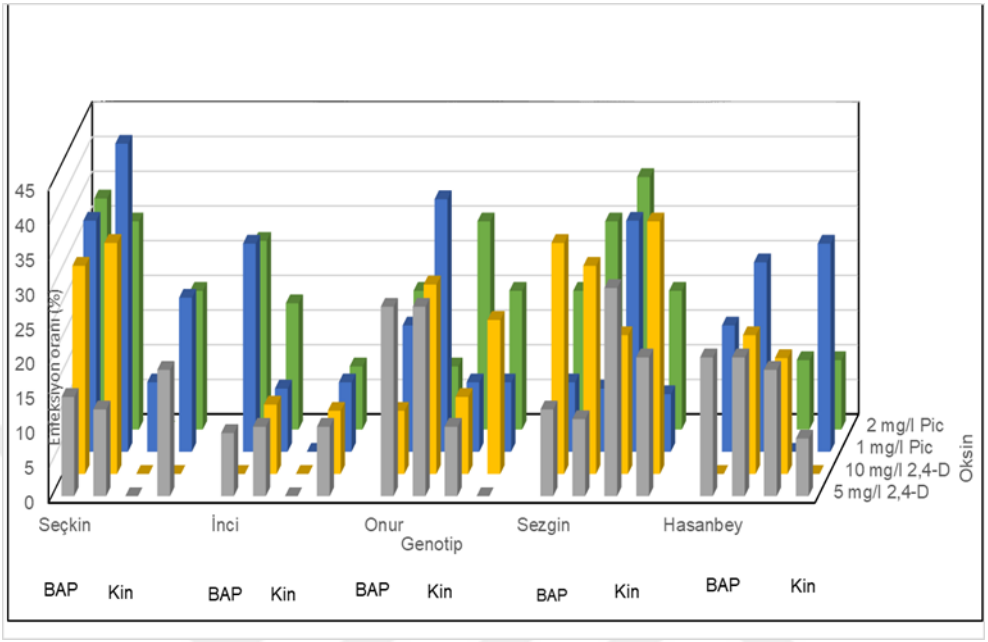
çıktığını saptamışlardır. Bu sonuçlar, araştırmamızda donör bitkilerin yetişme periyodunda sıcak ve nemli hava koşulları nedeniyle yüksek enfeksiyon ortaya çıkması sonucunu desteklemektedir.

Genotiplere bağlı olarak kültürlerde enfeksiyon oranı %9.6 ile %22.6 arasında değişmiştir. Sezgin çeşidinin anterlerinin bulunduğu petri kaplarında enfeksiyon oranı diğer çeşitlerdekine göre daha yüksek olmuştur. İnci çeşidi ile ilgili kültürlerde ise enfeksiyon oranı diğer çeşitlere göre daha düşük olmuştur. Odutayu ve ark. (2004), kenaf (*Hibiscus cannabis*) bitkisinin 3 çeşidine ait tohumları %70'lik alkol ile kısa süre sterilize ettikten sonra % 0.75 sodyum hipoklorit içeren solusyonda 20 dakika süre ile sterilize ettikleri ve daha sonra in vitro koşullarda kültüre aldıklarında gerek enfeksiyon oranının ve gerekse enfeksiyon kaynağının (bakteri veya mantar) genotiplere bağlı olarak önemli derecede farklılık gösterdiğini saptamışlardır.

Picloram içeren ortamlarda ortalama enfeksiyon oranı %17.9 olmasına karşılık, 2,4-D içeren ortamlarda bu oran %14.8 olmuştur (Çizelge 4.1). 5 mg/l 2,4-D içeren ortamlarda % 14 olan enfeksiyon oranı 10 mg/l 2,4-D içeren ortamlarda % 15.5 olmuş ve 2,4-D konsatrasyona bağlı olarak enfeksiyon oranında artış eğilimi ortaya çıkmıştır. Buna karşılık, 1 mg/l Picloram içeren ortamlarda % 18.5 olan enfeksiyon oranı 2 mg/l Picloram içeren ortamlarda %17.2 ile azalma eğilimi göstermiştir.

BAP içeren ortamlarda %19.6 olan enfeksiyon oranı ortalaması, kinetin içeren ortamlarda %13 olmuştur (Çizelge 4.1). BAP içermeyen ortamlarda %18.3 olan enfeksiyon oranı 0.5 mg/l BAP içeren ortamlarda %20.8, kinetin içermeyen ortamlarda %11.8 olan enfeksiyon oranı ortalaması 0.5 mg/l kinetin içeren ortamlarda %14 olmuş ve artış eğilimi göstermiştir.

Farklı genotip x besi ortamı kombinasyonlarında enfeksiyon oranları farklılık göstermiştir (Şekil 4.4).

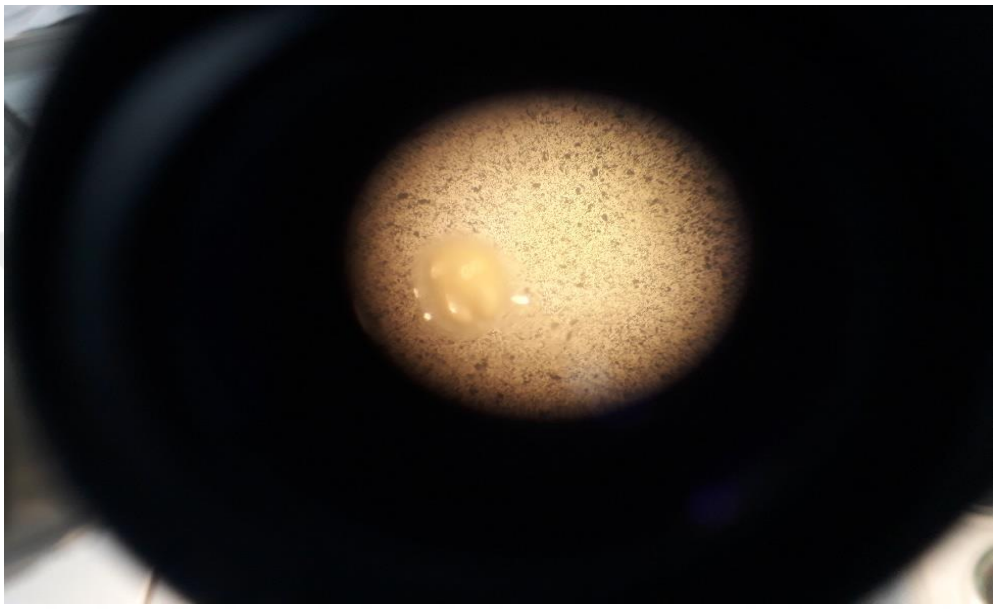


Şekil 4.4. Farklı genotip x besi ortamı kombinasyonlarında enfeksiyon oranları (%)

Kaplan ve ark. (2020), fındık sürgün uçlarını % 70'lik alkolde kısa süreli çalkaladıktan sonra %5 sodyum hipoklorit içeren hipo çözeltisinde 15 dakika süre ile sterilize etmişler ve farklı besi ortamı kombinasyonlarında kültüre almışlardır. Araştırıcılar, kültürlerdeki enfeksiyon oranının farklı besi ortamı kombinasyonlarında önemli derecede farklılık gösterdiğini saptamışlardır. Araştırıcıların bu bulguları bu araştırmada saptanan farklı genotip x besi ortamı kombinasyonlarında farklı enfeksiyon oranlarının ortaya çıkması şeklindeki bulguyu desteklemektedir.

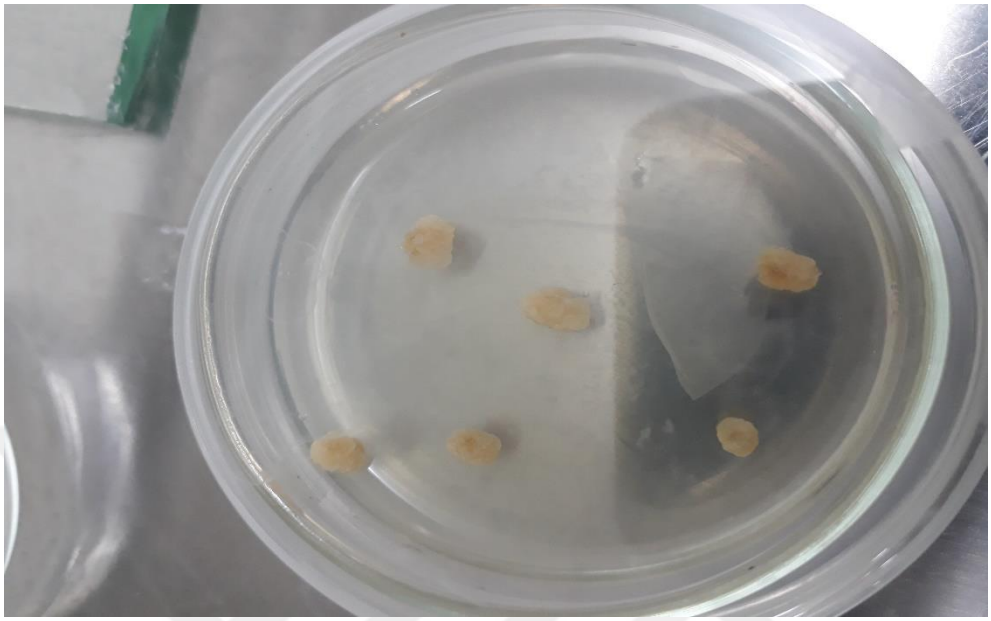
4.2. Anterlerin Reaksiyon Göstermesi

Kültür başlangıcından iki hafta sonra yapılan gözlemlerde, anterlerde büyüme ve şişme olduğu ve anterlerin beyazlaştığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.5).

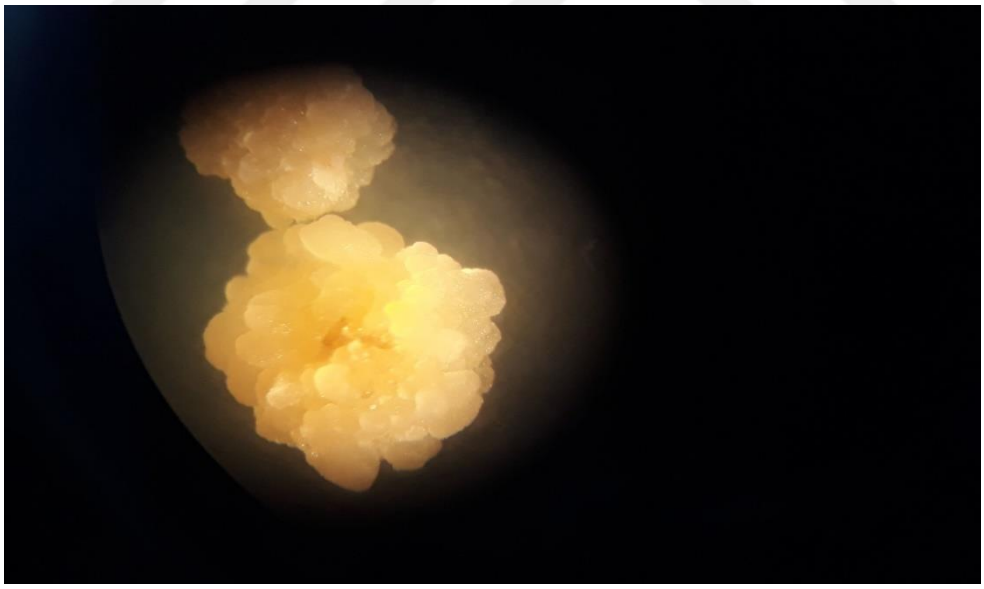


Şekil 4.1. Anterlerde şişme ve beyazlaşma (Kültür başlangıcından iki hafta sonra)

Anter yüzeyinde kallus oluşumu en erken kültür başlangıcından dört hafta sonra, en geç sekiz hafta sonunda yapılan gözlemlerde ortaya çıkmıştır. Dört haftanın sonunda yapılan gözlemlerde bazı anterlerde oluşan kallusların yumuşak, sulumturak yapıda olduğu (Şekil 4.6), bazılarında ise kallusların sert yapılı, embriyogenik olduğu (Şekil 4.7) gözlenmiştir.

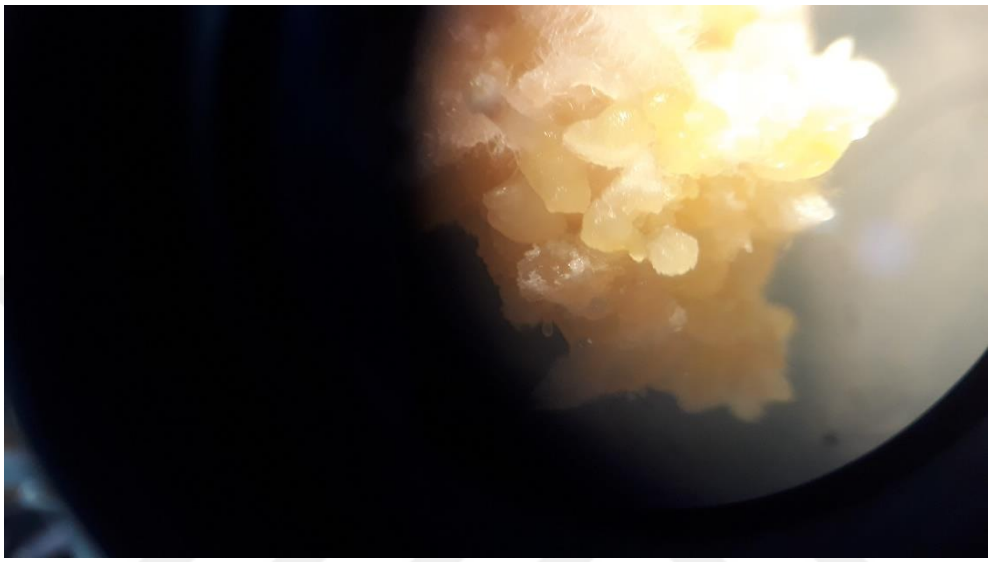


Şekil 4.2. Kültüre alınan anterlerde sulumturak, yumuşak yapılı kallus oluşumu (Kültür başlangıcından dört hafta sonra)



Şekil 4.3. Kültüre alınan anterlerde sert yapılı, embriyogenik kallus oluşumu (Kültür başlangıcından dört hafta sonra)

Embriyogenik kallus üzerinde kültür başlangıcından 6 hafta sonra globular yapılı embriyolar ortaya çıkmaya başlamıştır (Şekil 4.8).



Şekil 4.4. Embriyogenik kalluslar üzerinde somatik embriyo oluşumu (Kültür başlangıcından 6 hafta sonra)

Kültüre alınan anterlerde kallus ve embriyo oluşu ile ilgili gözlemler Özer (2020)'in gözlemleri ile benzerlik göstermektedir.

4.3. Anter Reaksiyon Oranı

Farklı nohut genotiplerinden izole edilen anterlerin farklı oksin çeşit ve konsantrasyonları ile farklı sitokinin çeşit ve konsantrasyonlarını içeren besi ortamlarında saptanan kallus ve/veya embriyo oluşturma oranı değerlerine uygulanan varyans analiz sonuçları Çizelge 4.2'de verilmiştir. Çizelge 4.2'de izlendiği gibi, sitokinin çeşidi ve genotip x sitokinin konsantrasyonu interaksiyonları anter reaksiyon oranını $P \leq 0.05$ hata sınırları içerisinde istatistiksel olarak önemli derecede etkilemiştir. Ayrıca genotip, oksin çeşidi ve sitokinin

Çizelge 4.1. Farklı nohut genotipi anterlerinin farklı besi ortamı kombinasyonlarında reaksiyon gösterme oranları ile ilgili varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F-Değeri
Tekerrür	4	535.295	10.2534**
Genotip (G)	4	484.265	9.2760**
Hata1	16		
Oksin Çeşidi (OÇ)	1	5404.642	53.7452**
G X OÇ	4	15.904	0.1582
Hata2	20		
Oksin Konsantrasyonu (OK)	1	37.556	0.6089
GXOK	4	83.048	1.3466
OÇXOK	1	1079.831	17.5084**
GXOÇXOK	4	75.825	1.2294
Hata3	40	61.675	
Sitokinin Çeşidi (SÇ)	1	331.690	4.2125*
GXSÇ	4	493.325	6.2652**
OÇXSÇ	1	13.938	0.1770
GXOÇXSÇ	4	46.5891	0.5891
OKXSÇ	1	42.176	0.5356
GXOKXSÇ	4	45.930	0.5833
OÇXOKxSÇ	1	552.857	7.0213**
GXOKXOÇXSÇ	4	92.635	1.1765
Hata4	80	78.740	
Sitokinin Konsantrasyonu(SK)	1	3715.313	70.8938**
GXSK	4	157.118	2.9980*
OÇXSK	1	44.457	0.8483
GXOÇXSK	4	45.153	0.8616
OKXSK	1	1.712	0.0327
GXOKXKS	4	82.357	1.5715
OÇXOKXSK	1	85.522	1.6319
GXOÇXOKXSK	4	95.249	1.8175
SÇXSK	1	80.226	1.5308
GXSÇXSK	4	95.800	1.828
OÇXSÇXSK	1	28.589	0.5455
GXOÇXSÇXSK	4	56.195	1.0723
OKXSÇXSK	1	94.409	1.8014
GXOKXSÇXSK	4	36.144	0.6897
OÇXOKXSÇXSK	1	85.331	1.6282
GXOÇXOKXSÇXSK	4	39.681	0.7572
Hata5	160	52.407	
Genel	399		

*) P≤0.05 hata sınırları içerisinde istatistiksel olarak önemli; **) P≤0.01 hata sınırları içerisinde istatistiksel olarak önemli

konsantrasyonu ile oksin çeşidi x oksin konsantrasyonu ve genotip x sitokinin çeşidi, oksin çeşidi x oksin konsantrasyonu x sitokinin çeşidi interaksiyonları anter reaksiyon oranını P≤0.01 hata sınırları içerisinde istatistiksel olarak önemli derecede etkilemiştir.

Araştırmada tüm uygulamaların ortalaması olarak EDM ortamında kültüre alınan anterlerin % 6.4'ü kallus ve/veya embriyod oluşturmuştur (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.2. Farklı Nohut Genotiplerinde Anterlerin Farklı Oksin Çeşit ve Konsantrasyonlarını İçeren Ortamlardaki Reaksiyonu Oranı Ortalamaları (%)

Genotip	2,4-D		Picloram		Ortalama
	5 mg/l	10 mg/l	1 mg/l	2 mg/l	
Seçkin	8.0 (13.413)+	3.5 (7.605)	0.2 (2.253)	1.5 (4.512)	3.3 (6.946)b[1]
İnci	9.7 (16.247)	11.8 (18.382)	2.2 (6.622)	5.2 (10.215)	7.2 (12.867) a
Onur	14.2 (20.077)	7.7 (11.716)	2.7 (6.860)	6.0 (10.591)	7.6 (12.311) a
Sezgin	13.0 (17.926)	8.5 (13.973)	4.0 (8.499)	6.0 (10.196)	7.9 (12.648)a
Hasanbey	10.2 (16.353)	6.7 (12.844)	3.2 (6.592)	3.8 (8.679)	6.0 (11.117) a
Ortalama	11.0 (16.803) a[2]	7.6 (12.904) b	2.4 (6.165) d	4.5 (8.839) c	6.4 (11.179)
Ortalama	9.3 (14.854) a[3]		3.5 (7.502) b		

+) Açı değeri

[1])Aynı sütun içerisinde benzer harf ile gösterilen ortalamalar Duncan testine göre P≤ 0.05 hata sınırları içerisinde istatistiksel olarak birbirinden farksızdır.

2) Aynı satırda benzer harf ile gösterilen ortalamalar Duncan testine göre P≤ 0.05 hata sınırları içerisinde istatistiksel olarak birbirinden farklıdır.

3) Aynı satırda farklı harf ile gösterilen ortalamaları P≤ 0.05 hata sınırları içerisinde istatistiksel olarak birbirinden farklıdır

Kennedy ve ark. (2002), 5 nohut çeşidinde anter reaksiyon oranının % 27 ile %93 arasında değiştiğini saptamışlardır. Abdollahi ve Rashidi (2018) ise daha önceden iyi reaksiyon gösterdiği saptanan iki nohut çeşidi ile yürüttükleri araştırmada anterlerin kallus oluşturma oranının kültür öncesi soğuk uygulama süresi ve kültür başlangıcında sıcaklık uygulamasına bağlı olarak %3.3 ile %43.3

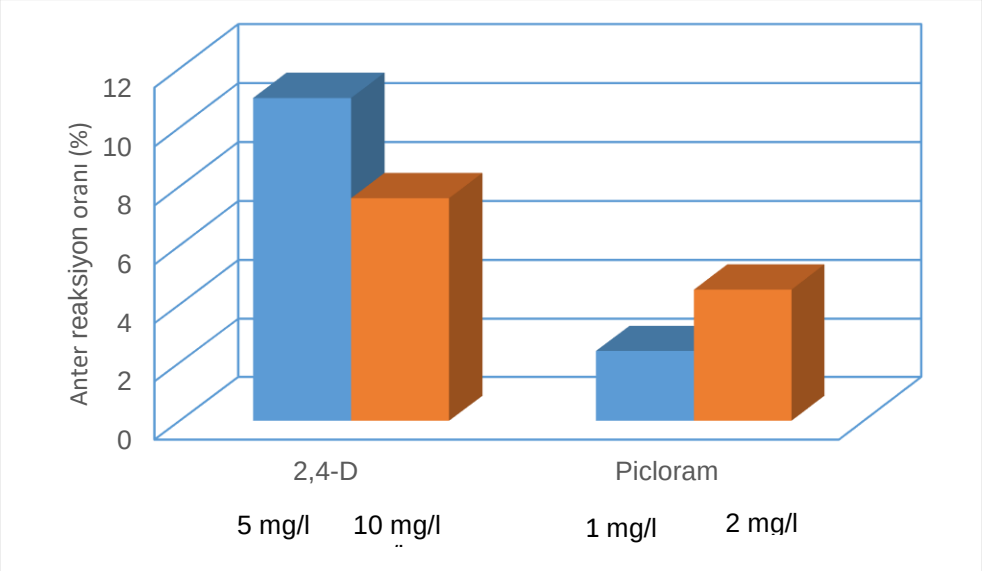
arasında değiştiğini saptamışlardır. Grawel ve ark. (2009), iki nohut genotipinin kültür öncesi ve sonrası farklı stres uygulamaları yapılan anterlerinde anter reaksiyon oranının %39-%69 arasında değiştiğini saptamışlardır. Söz konusu anter reaksiyon oranı değerleri bu araştırmada saptanan anter reaksiyon oranı ortalamasının üzerindedir. Bu duruma neden olarak sayılan araştırmalarda daha önceden anter kültüründe test edilmiş genotipler kullanılmasına karşılık, bu araştırmada kullanılan nohut genotiplerinin ilk defa anter kültüründe test edilmesi ve anter kültürüne reaksiyonun genotipe bağımlı olması gösterilebilir.

Araştırmada anter reaksiyon oranı ortalamaları genotiplere bağlı olarak %3.3 ile %7.9 arasında değişmiş (Çizelge 4.3) ve bu değişimin istatistiksel olarak önemli olduğu ortaya çıkmıştır (Çizelge 4.2). Seçkin çeşidinin anterleri %3.3 anter reaksiyon oranı ile diğer çeşitlerinkine göre önemli derecede daha düşük anter reaksiyon oranı göstermiştir. Sezgin çeşidi %7.9'luk anter reaksiyon oranı ile en yüksek anter reaksiyon oranı gösteren çeşit olmuştur. Ancak, söz konusu çeşidin anter reaksiyon oranı açısından Seçkin çeşidi dışındaki çeşitlerden istatistiksel olarak önemli derecede farklı olmadığı ortaya çıkmıştır. Araştırmada anter reaksiyon oranının genotiplere bağlı olarak önemli derecede değişmesi şeklindeki sonuç, Huda ve ark. (2001), Croser (2002), Vesal ve ark. (2002), Kennedy ve ark. (2002), Grewal ve ark. (2009), Abdollahi ve Rashidi (2018) ve Özer (2020)'in bulgularını desteklemektedir.

Araştırmada test edilen iki farklı oksin çeşidi (2,4-D, ve Picloram) anter reaksiyon oranında istatistiksel olarak önemli derecede farklılık yaratmıştır (Çizelge 4.2). Nitekim, 2,4-D içeren ortamlarda kültüre alınan anterlerin ortalama reaksiyon oranı %9.3 olmasına karşılık, Picloram içeren ortamlarda kültüre alınan anterlerde ise %3.5 olarak gerçekleşmiştir. Araştırmada 2,4-D, Piclorama göre istatistiksel olarak önemli derecede daha yüksek anter reaksiyon oranı sağlamıştır. Bu sonuç Özer (2020)'in bulgularını desteklemektedir. Ayrıca, Croser (2002), Vessal ve ark. (2002), Kennedy ve ark. (2002), Abdollahi ve Rashidi (2018) ve Rashidi ve ark. (2019)'un nohut anter kültüründe anterlerden kallus oluşumu için 2,4-D'nin etkili

bir oksin olduğu şeklindeki bulguları da bu araştırmada saptanan 2,4-D'nin Piclorama göre daha yüksek anter reaksiyon oranına neden olması ile ilgili sonucu desteklemektedir. Buna karşılık, Huda ve ark. (2003), yaptıkları araştırmada NAA'nın anterlerden kallus indüksiyonu açısından 2,4-D'ye göre daha etkin olduğunu, buna karşılık oluşan kallus kalitesi açısından 2,4-D'nin daha etkin olduğunu saptamışlardır.

Araştırmada oksin konsantrasyonunun anter reaksiyon oranı üzerindeki etkisi oksin çeşidine bağlı olarak değişmiştir (Çizelge 4.2). Nitekim, 2,4-D konsantrasyonunun 5 mg/l'den 10 mg/l'ye çıkartılması anter reaksiyon oranında istatistiksel olarak önemli derecede azalmaya neden olmasına karşılık, Picloram konsantrasyonunun 1 mg/l'den 2 mg'l'ye çıkartılması anter reaksiyon oranında istatistiksel olarak önemli derecede artışa neden olmuştur (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.9).



Şekil 4.1. Farklı oksin çeşit ve konsantrasyonlarının anter reaksiyon oranına etkisi

Vessal ve ark. (2002)'nın nohutta 2,4-D konsantrasyonunun artması ile anterlerden kallus oluşum oranının azaldığı şeklindeki bulgusu bu araştırmada saptanan 2,4-D konsantrasyonunun artması ile anter reaksiyon oranının azalması

şeklindeki bulguyu desteklemektedir. Buna karşılık, Grewal ve ark. (2009), nohut anter kültüründe en yüksek anter başına embriyo sayısını 10 mg/l 2,4-D içeren ortamdan elde etmişlerdir.

Varyans analizi sonuçları, araştırmada test edilen iki sitokinin çeşidinin (BAP ve kinetin) anter reaksiyon oranıda önemli derecede farklılık yarattığını ortaya koymuştur (Çizelge 4.2). Nitekim, BAP içeren ortamlarda anter reaksiyon oranı ortalaması %5.8 olmasına karşılık, kinetin içeren ortamlarda %7.1 olmuş ve kinetinin anter reaksiyon oranı açısından BAP'a göre daha etkin olduğu ortaya çıkmıştır (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.3. Farklı Nohut genotiplerinde anterlerin farklı sitokinin çeşit ve konsantrasyonlarını İçeren ortamlardaki reaksiyonu oranı ortalamaları (%)

Genotip	BAP			Kinetin			
	0 mg/l	0.5 mg/l	ort	0 mg/l	0.5 mg/l	ort	Ort
Seçkin	2.7 (6.51) +	3.3 (6.39)	3.0 (6.45) c[2]	1.8 (5.23)	5.3 (9.65)	3.6 (7.44) c	3.3 (6.96)b[1]
İnci	4.0 (9.61)	10.5 (16.80)	7.3 (13.21)b	4.7 (9.56)	9.7 (15.49)	7.2 (12.53) b	7.2 (12.87)a
Onur	5.8 (9.62)	9.5 (14.27)	7.7 (11.94)b	5.7 (10.36)	9.5 (15.0)	7.6 (12.68) b	7.6 (12.31)a
Sezgin	1.5 (4.78)	5.7 (10.13)	3.6 (7.46) c	5.7 (11.14)	18.7 (24.50)	12.2 (17.84) a	7.9 (12.65)a
Hasanbey	3.8 (7.81)	10.3 (16.75)	7.1 (24.56) b	2.0 (6.67)	7.7 (13.24)	4.8 (9.96)bc	6.0 (11.12)a
Ortalama	3.6 (7.67)	7.9 (12.87)	5.8 B[3]	4 (8.59)	10.2 (15.58)	7.1 A	6.4 (11.18)

+) Açı değeri

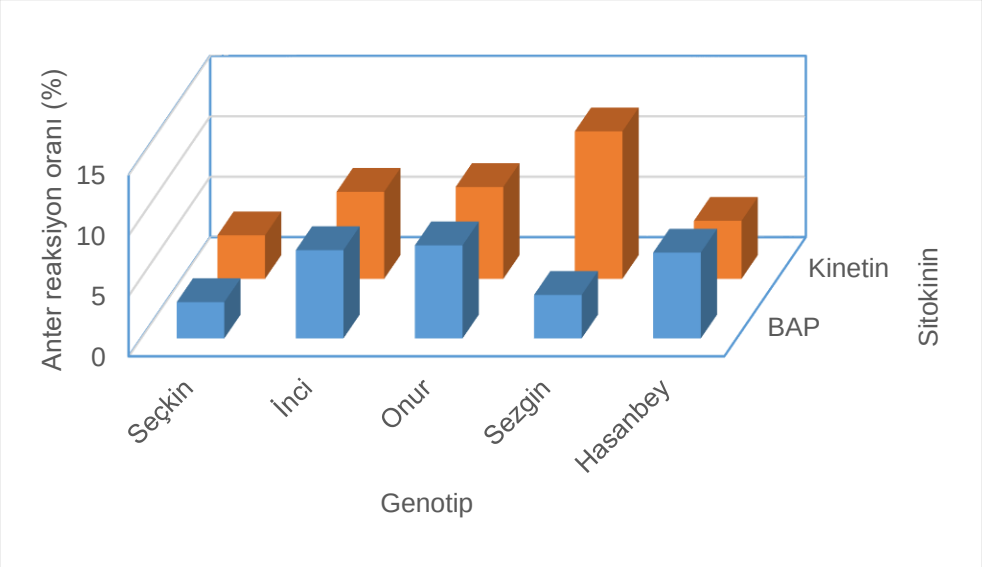
[1])Aynı sütun içerisinde benzer harf ile gösterilen ortalamalar Duncan testine göre P≤ 0.05 hata sınırları içerisinde istatistiksel olarak birbirinden farksızdır.

2) Benzer harf ile gösterilen ile gösterilen genotip- sitokinin çeşidi kombinasyon ortalamaları P≤ 0.05 hata sınırları içerisinde istatistiksel olarak birbirinden farksızdır.

3) Farklı büyük harf ile gösterilen ortalamaları istatistiksel olarak birbirinden farklıdır.

Huda ve ark. (2001), BAP'ın kinetine göre nohut anter kültüründe anterlerden kallus oluşumu açısından daha etkin olduğunu saptamışlardır. Ancak, araştırıcılar araştırmalarında BAP'ın 2 mg/l konsantrasyonunu kullanmışlardır. Bu araştırmada ise BAP ve kinetinin 0.5 mg/l konsantrasyonu test edilmiştir. Huda ve ark. (2001)'ın sonuçlarına karşılık bir çok nohut anter kültürü araştırmasında sitokinin olarak kinetinin kullanıldığı görülmektedir (Vessal ve Ark., 2002; Kennedy ve ark., 2002; Özer, 2020).

Varyans analizi sonuçları genotip x sitokinin çeşidi interaksiyonunun istatistiksel olarak önemli olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.2). Bu sonuç, sitokininlerin anter reaksiyon oranı üzerindeki etkisinin genotiplere bağlı olarak önemli derecede farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur. Nitekim, araştırmada test edilen 5 nohut çeşidinden 4'ünde sitokinin çeşitleri anter reaksiyon oranında önemli bir farklılık yaratmamasına karşılık, Sezgin çeşidinde kinetin BAP'a göre önemli derecede daha yüksek anter reaksiyon oranı sağlamıştır (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.10) .



Şekil 4.2. Farklı nohut genotiplerinde farklı sitokinin çeşitlerinin anter reaksiyon oranına etkisi

Araştırmada, sitokinlerin anter reaksiyon oranı üzerindeki etkisinin genotiplere bağlı olarak farklılık göstermesi ile ilgili olarak saptanan bulgu Huda ve ark. (2001), Vessal ve ark. (2002) ve Özer (2020)'in bulgularını desteklemektedir.

Varyans analizi sonuçları oksin çeşidi x oksin konsantrasyonu x sitokinin çeşidi interaksiyonunun istatistiksel olarak önemli olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.2). Bu sonuç, sitokinin çeşitlerinin anter reaksiyon oranı üzerindeki etkisinin farklı oksin çeşidi x oksin konsantrasyonu kombinasyonlarında farklılık gösterdiğini ortaya koymaktadır. Nitekim, 5 mg/l 2,4-D + BAP içeren ortamlarda % 9.5 olan anter reaksiyon oranı 5 mg/l 2,4-D + kinetin içeren ortamlarda % 12.5 olmuş ve ortama sitokinin olarak BAP yerine kinetin ilavesi anter reaksiyon oranında önemli derecede artışa neden olmuştur(Çizelge 4.5 ve Şekil 4.11).

Çizelge 4.4 Nohut anterlerinin farklı oksin çeşit ve konsantrasyonları ile farklı sitokinin çeşidi içeren besi ortamlardaki anter reaksiyonu oranı ortalamaları (%)

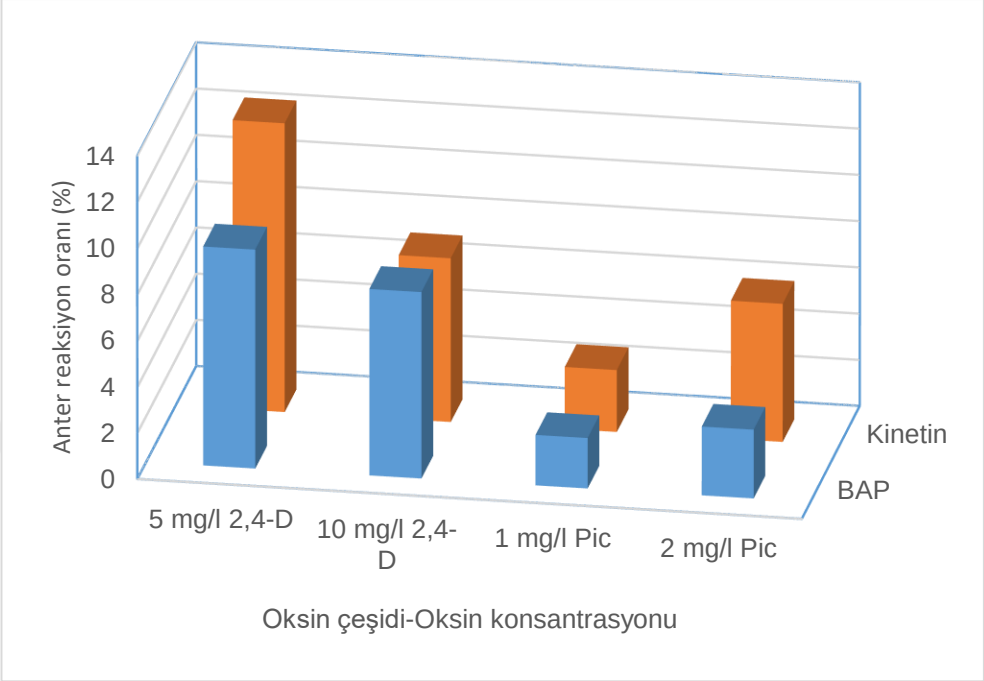
Sitokinin Çeşidi	2,4-D konsantrasyonu (mg/l)		Picloram konsantrasyonu (mg/l)		Ortalama
	5 mg/l	10 mg/l	1 mg/l	2 mg/l	
BAP	9.5 b (14.579)	8.1 b[2] (19.027)	2.2 c (13.681)	3.0 c (12.128)	5.8 b[1] (14.85375)
Kinetin	12.5 a (5.919)	7.1 b (6.412)	2.7 c (6.890)	6.0 b (10.787)	7.1 a (7.502)
Ortalama	11.0 (10.249)	7.6 (12.720)	2.5 (10.285)	4.5 (11.457)	
Ortalama	9.3 a[3] (11.4845)		3.5 b (10.871)		

+) Açı değeri

1) Aynı sütun içerisinde farklı harf ile gösterilen sitokinin çeşidi ortalamaları P≤ 0.05 hata sınırları içerisinde istatistiksel olarak birbirinden farklıdır.

2) Benzer harf ile gösterilen oksin çeşidi x oksin konsantrasyonu x sitokinin çeşidi kombinasyon ortalamaları Duncan testine göre P≤ 0.05 hata sınırları içerisinde istatistiksel olarak birbirinden farksızdır.

3) Aynı satır içerisinde farklı harf ile gösterilen oksin çeşidi ortalamaları P≤ 0.05 hata sınırları içerisinde istatistiksel olarak birbirinden farklıdır.



Şekil 4.3. Farklı oksin çeşit ve konsantrasyonu ile farklı sitokinin çeşidi içeren besi ortamlarında anter reaksiyon oranı

Buna karşılık 10 mg/l 2,4-D içeren ortamlarda sitokinin çeşidi anter reaksiyon oranında önemli bir farklılık yaratmamıştır (Çizelge 4.5 ve Şekil 4.11). 1 mg/l Picloram içeren ortamlarda da Sitokinin çeşidi anter reaksiyon oranında önemli bir farklılık yaratmamıştır. 2 mg/l picloram içeren ortamlarda ise kinetin BAP'a göre anter reaksiyon oranında istatistiksel olarak önemli derecede artışa neden olmuştur (Çizelge 4.5 ve Şekil 4.11).

Farklı oksin çeşidi x oksin konsantrasyonu x sitokinin çeşidi kombinasyonlarında anter reaksiyon oranın farklılık göstermesi ile ilgili sonuçlar Huda ve ark. (2001) ve Vessal ve ark. (2002)'nın bulguları ile uyumludur.

Varyans analizi sonuçları sitokinin konsantrasyonunun anter reaksiyon oranını istatistiksel olarak önemli derecede etkilediğini göstermiştir (Çizelge 4.2). Nitekim, sitokinin içermeyen ortamlarda % 3.8 olan anter reaksiyon oranı ortalaması, 0.5 mg/l sitokinin içeren ortamlarda % 9 olarak gerçekleşmiş ve ortamda

sitokinin bulunması anter reaksiyon oranında önemli derecede artışa neden olmuştur (Çizelge 4.6). Bu sonuç, Huda ve ark. (2001)'nın ''nohut anter kültüründe kallus indüksiyonu için besi ortamına yalnız başına oksin ilavesi yerine oksin+ sitokinin ilavesinin daha uygun olduğu'' şeklindeki bulgularını desteklemektedir.

Çizelge 4.5 Farklı nohut genotiplerinde anterlerin farklı konsantrasyonlarda sitokinin içeren besi ortamlarında reaksiyonu oranı ortalamaları (%)

Genotip	Sitokinin konsantrasyonu (mg/l)		Ortalama
	0	0.5	
Seçkin	2.2 (5.872) + c[2]	4.3 (8.019) bc	3.3 (6.946) b[1]
İnci	4.3 (9.586) b	10.1 (16.147) a	7.2 (12.867) a
Onur	5.7 (9.991) b	9.5 (14.631) a	7.6 (12.311) a
Sezgin	3.6 (7.962) bc	12.2 (17.33) a	7.9 (12.648)a
Hasanbey	2.9 (7.239) bc	9.0 (14.995) a	6.0 (11.117) a
Ortalama	3.8 (5.13) b[3]	9.0 (14.225) a	6.4 (11.179)

+) Açı değeri

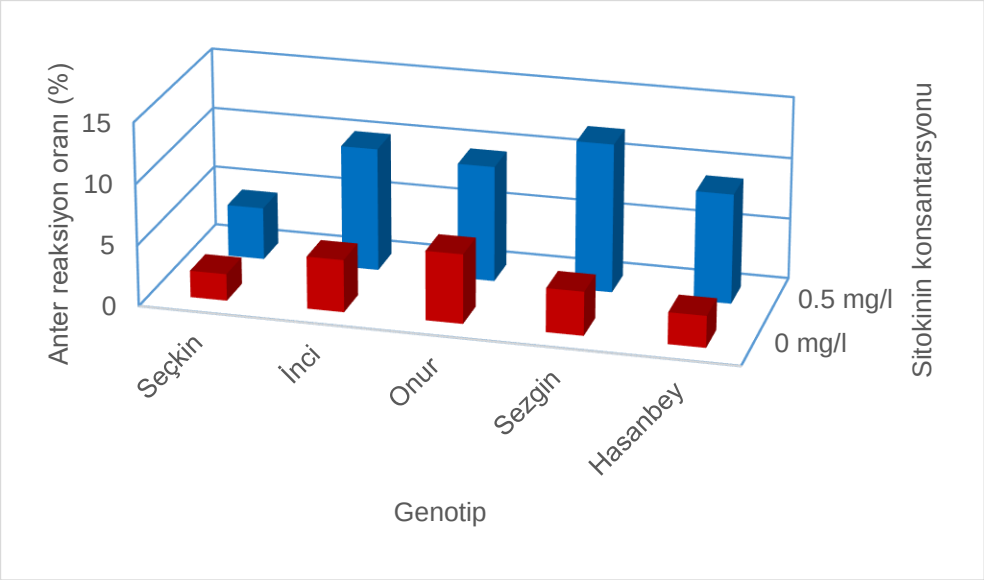
1) Aynı sütun içerisinde farklı harf ile gösterilen ortalamalar Duncan testine göre P≤ 0.05 hata sınırları içerisinde istatistiksel olarak birbirinden farklıdır.

2) Benzer harf ile gösterilen Genotip X Sitokinin konsantrasyonu kombinasyon ortalamaları Duncan testine göre P≤ 0.05 hata sınırları içerisinde istatistiksel olarak birbirinden farksızdır.

3) Aynı satır içerisinde farklı harf ile gösterilen sitokinin konsantrasyonu ortalamaları P≤ 0.05 hata sınırları içerisinde istatistiksel olarak birbirinden farklıdır.

Varyans analizi sonuçları genotip x sitokinin konsantrasyonu interaksiyonunun istatistiksel olarak önemli olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.2). Bu sonuç, sitokinin konsantrasyonunun etkisinin genotiplere bağlı olarak değiştiğini ortaya koymaktadır. Nitekim, Seçkin çeşidinde sitokinin konsantrasyonu anter reaksiyon oranında istatistiksel olarak önemli bir farklılık yaratmamasına karşılık, diğer çeşitlerde besi ortamına 0.5 mg/l sitokinin ilave edilmesi anter reaksiyon oranında sitokinin içermeyen ortama göre istatistiksel olarak önemli derecede artışa

neden olmuştur (Çizelge 4.5 ve Şekil 4.12).

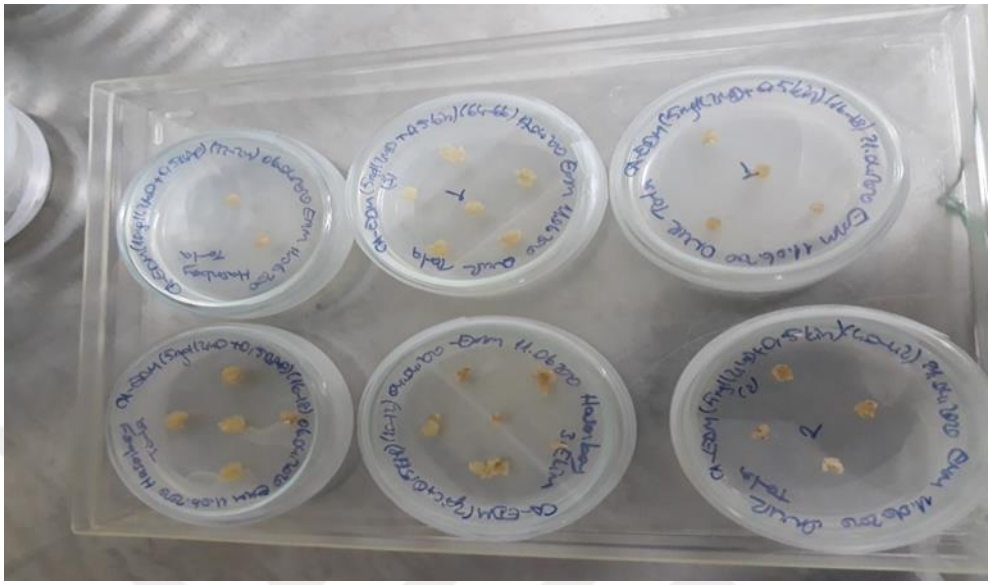


Şekil 4.4. Farklı genotiplerde farklı sitokinin konsantrasyonlarının anter reaksiyon oranına etkisi

Sitokinin konsantrasyonunun anter reaksiyon oranına etkisinin genotiplere bağlı olarak değişmesi Huda ve ark. (2001)'nın bu konudaki bulgularını desteklemektedir.

4.4. Bitki Rejenerasyonu

Kültüre alınan anterlerden oluşan kallus ve embriyolar kültür başlangıcından 6-8 hafta sonra Grawel ve ark. (2009) tarafından önerilen ve bileşimi Çizelge 3.1'de verilen embriyo olgunlaştırma (EMM) ortamına aktarılmıştır (Şekil 4. 13). EMM ortamına aktarılan kültürler %70 nem 24º C sıcaklık koşullarının sağlandığı iklim dolaplarına yerleştirilmiştir. Söz konusu ortamda 4 hafta kalan kalluslarda embriyolar belirgin hale gelmiş (Şekil 4.14) ve bazı kalluslarda kök rejenerasyonu başlamıştır (Şekil 4.15). Bunun yanında bazı kallus ve embriyolarda kararma ve ölüm ortaya çıkmıştır (Şekil 4.16).



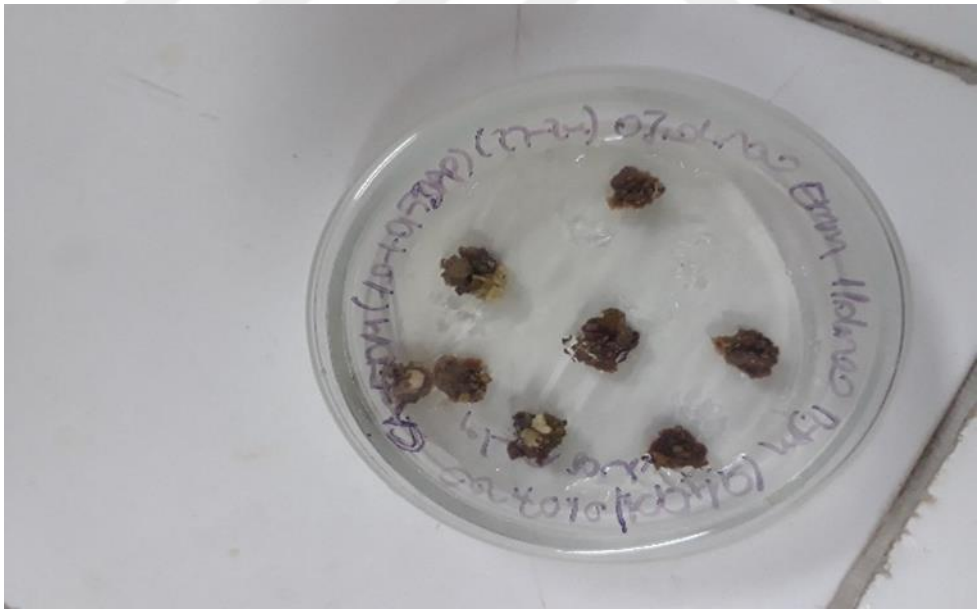
Şekil 4.1. EMM ortamına aktarılan kallus ve embriyolar (Kültür başlangıcından 6-8 hafta sonra)



Şekil 4.2. EMM ortamında kalluslarda ortaya çıkan ok ucu şeklindeki embriyolar (Kültür başlangıcından 10-12 hafta sonra)



Şekil 4.3. EMM ortamında olgun embriyolar ve kök rejenerasyonu (Kültür başlangıcından 10-12 hafta sonra)



Şekil 4.4. EMM ortamında kallus ve embriyolarda kuruma



Şekil 4.5. Rejenerasyon ortamına aktarılan kallus ve embriyolar (Kültür başlangıcından 10-12 hafta sonra)



Şekil 4.6. Rejenerasyon ortamına aktarılan kallus ve embriyolarda klorofil oluşumu

EMM ortamında 4 haftalık kültür sonunda, olgunlaşan embriyolar Grewal ve ark. (2009) tarafından önerilen ve bileşimi Çizelge 3.1'de verilen rejenerasyon (PRM) ortamına aktarılmıştır (Şekil 4.17). Rejenerasyon ortamına aktarılan kallus / embriyolar % 70 nem 24^{o} C sıcaklık ve 8 saat karanlık 16 saat ışık koşullarının sağlandığı iklim dolabına yerleştirilmiştir. Kallus ve embriyolar rejenerasyon ortamında 2-3 gün içinde yeşil renk almıştır (Şekil 4.18).

Ancak, rejenerasyon ortamına aktarılan kallus ve embriyolardan sürgün rejenerasyonu gerçekleşmemiş ve rejenerasyon ortamında 4 hafta kalan kallus ve embriyolar, yeni rejenerasyon ortamına aktarılmalarına rağmen herhangi bir gelişme göstermemişler ve siyahlaşarak ölmüşlerdir. Araştırmada bitki rejenerasyonu ile ilgili gözlemler Özer (2020)'in gözlemleri ile genel olarak uyumludur. Ancak, Özer (2020)'in araştırmasında embriyolardan bitki rejenerasyonu gerçekleşmesine karşılık bu araştırmada bitki rejenerasyonu gerçekleşmemiştir. Araştırmada elde edilen bulgular bezelyede anterlerden embriyogenik kallus ve embriyo elde edilmesine karşılık hiç bitki rejenerasyonunun gerçekleşmediğini bildiren Ribalta (2014)'nın bulguları ile uyum içindedir. Ayrıca, daha önce nohut anter kültürü konusunda yapılan ve kallus ve embriyo elde edilmesine karşılık haploid bitki elde edilemeyen Khan ve Gosh (1983), Altaf ve Ahmad (1986), Gosal ve Bajaj (1988), Croser (2002), Vessal ve ark. (2002), Croser ve ark. (2011), Panchangam ve ark. (2014)'ın bulguları ile uyumludur.

Diğer bitki gruplarında olduğu gibi yemeklik dane baklagillerde de anter kültüründe başarı bir çok faktör tarafından etkilenir (Gatti ve ark., 2016; Pratap ve ark., 2018).Bu faktörler arasında; genotip, donor bitkilerin yetişme koşulları, anter kültürü için anterlerin izolasyonu sırasında anterler içindeki, mikrosporların gelişme dönemi, anterler izole edilmeden önce çiçek tomurcuklarına ön uygulama yapılması, kültür ortamı ve kültür koşulları sayılabilir (Germana, 2006; Lulsdorf ve ark., 2011, Gatti ve ark, 2016; Paratap ve ark, 2018).

Diğer in vitro kültür tekniklerinde olduğu gibi anter kültüründe de başarıyı etkileyen en önemli faktör genotiptir (Gosal ve Bajaj, 1988; Zhao ve ark., 1998; Croser, 2002; kennedy ve ar., 2003; Vessal ve ark., 2002; Croser ve Lulsdorf, 2004; Ochatt ve ar., 2009; Grewal ve ark., 2009; Bobkov, 2010; Croser ve ark., 2011; Bobkow, 2014;Ribalta, 2014; Panchangam ve ark. , 2014; Davies, 2015; Deswal, 2018; Abdollahi ve Rashidi, 2018; Bermejo ve ark., 2020; Özer, 2020).

Nohut bitkisinde anter kültürü konusunda yapılan araştırmalar da ,mikrospor orijinli olduğu kesin olarak ortaya konulmuş haploid bitkiler Grawel ve ark (2009)

ve Abdollahi ve Rashidi (2018) tarafından yapılan araştırmalarda elde edilmiştir. Diğer bazı araştırmalarda anter kültüründe bitkiler elde edilmiş, ancak bu bitkilerin genellikle diploid olduğu saptanmış ve mikrospor orijinli olup olmadıkları incelenmemiştir (Özer, 2020). Gerek Grewal ve ark. (2009) ve gerekse Abdollahi ve Rashidi (2018)'nin araştırmalarında anter kültürüne iyi reaksiyon gösterdiği önceden saptanan genotipler kullanılmıştır. Bu araştırmada ise, daha önce anter kültüründe test edilmemiş genotipler kullanılmıştır. Ancak, bu araştırmada haploid bitki rejenerasyonunun gerçekleşmemiş olmasının bir çok nedeni olabilir. Araştırmada test edilen genotipler yanında kullanılan besi ortamının bileşimi, donör bitkilerin yetişme koşulları, anterlere kültür öncesi ve sonrası sıcak veya soğuk stresi uygulanması, anterlerin kültür koşulları gibi bir çok faktör araştırmada test edilen nohut genotiplerinin anterlerinden haploid bitki rejenere olmamasının nedeni olabilir. Günümüzde ıslah programlarında haploid bitki elde etme amacıyla anter kültürü tekniğinin yaygın olarak kullanılabildiği bir dane baklagil bitki türü bulunmamaktadır. Ancak, ıslah programlarında bu tekniğin yaygın olarak kullanılabilmesine yönelik olarak ulusal ve uluslararası araştırma projeleri (Davies, 2015) yürütülmektedir. Yüksek lisans tez çalışması olarak yürütülen bu araştırma ülkemizde nohut bitkisinde anter kültürü konusunda yürütülen sayılı araştırmalardan birisini oluşturmaktadır. Ülkemizdeki nohut ıslah programlarında anter kültürü tekniğinden yararlanarak ıslah sürecinin kısaltılabilmesi için, öncelikle ülkemiz nohut gen kaynaklarının anter kültürüne reaksiyon açısından test edilmesi ve anterlerden haploid bitki elde etme protokolünün optimizasyonuna yönelik olarak uygun besi ortamı, besi ortamı büyüme düzenleyicisi içeriği, kültür öncesi ve sonrası uygun stres yönteminin belirlenmesi ve anterler için uygun kültür koşullarının belirlenmesine yönelik araştırmaların yürütülmesi gerekir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Nohut anter kültüründe oksin çeşidi (2,4-D ve Picloram) ve konsantrasyonu (5 mg/l, 10 mg/l;1 mg/l, 2 mg/l) ile sitokinin çeşidi (BAP ve Kin) ve konsantrasyonunun (0 mg/l, 0.5 mg/l) farklı nohut genotiplerinde haploid bitki oluşumuna etkisini saptamak amacıyla yürütülen bu araştırmada; Seçkin, İnci, Onur, Sezgin ve Hasanbey genotipleri test edilmiştir.

Söz konusu genotiplerin saksı ve arazi koşullarında yetiştirilen donör bitkilerinden hasat edilen 2-3 mm uzunluğundaki tomurcuklara 7 gün süre 4 °C'de soğuk uygulaması yapıldıktan sonra steril koşullarda sodyum hipoklorit çözeltisi ile sterilize edilmiş ve içlerindeki anterler izole edilerek farklı oksin çeşit ve konsantrasyonları ile farklı sitokinin çeşit ve konsantrasyonlarını içeren 16 farklı EDM ortamında kültüre alınmıştır.

Araştırmada elde edilen bulgular aşağıdaki gibi özetlenebilir.

1) Araştırmada, tüm uygulamaların ortalaması olarak saptanan enfeksiyon oranı %16.4 olarak gerçekleşmiştir. Yani anterlerin kültüre alındığı toplam 466 petri kabından 66'sında enfeksiyon ortaya çıkmıştır. Enfeksiyon oranı farklı genotip x besi ortamı kombinasyonlarında %0 ile %44.4 arasında değişmiştir.

2) Araştırmada tüm faktör kombinasyonlarının ortalaması olarak anter reaksiyon oranı %6.4 olmuştur. Anter reaksiyon oranı genotiplere bağlı olarak %3.3 ile %7.9 arasında değişmiş ve bu değişimin istatistiksel olarak önemli olduğu ortaya çıkmıştır. Sezgin % 7.9 olarak anter reaksiyon oranı ile en yüksek anter reaksiyon oranı gösteren genotip olmuştur. İnci, Onur ve Hasanbey çeşitleri istatistiksel olarak Sezgin çeşidinden istatistiksel olarak farklı olmayan anter reaksiyon oranları göstermiştir.

3) Araştırmada test edilen iki farklı oksin çeşidi (2,4-D, ve Picloram) anter reaksiyon oranında istatistiksel olarak önemli derecede etkilemiştir. 2,4-D içeren ortamlarda kültüre alınan anterlerin ortalama reaksiyon oranı %9.3 olmasına

karşılık, Picloram içeren ortamlarda kültüre alınan anterlerde ise % 3.5 olarak gerçekleşmiştir. Araştırmada 2,4-D, piclorama göre daha yüksek anter reaksiyon oranı sağlamıştır.

4) Araştırmada oksin konsantrasyonunun anter reaksiyon oranı üzerindeki etkisi oksin çeşidine bağlı olarak değişmiştir. 2,4-D konsantrasyonunun 5 mg/l'den 10 mg/l'ye çıkartılması anter reaksiyon oranında istatistiksel olarak önemli derecede azalmaya neden olmasına karşılık, Picloram konsantrasyonunun 1 mg/l'den 2 mg/l'ye çıkartılması anter reaksiyon oranında istatistiksel olarak önemli derecede artışa neden olmuştur.

5) BAP içeren ortamlarda anter reaksiyon oranı ortalaması %5.8 olmasına karşılık, kinetin içeren ortamlarda %7.1 olmuş ve kinetinin anter reaksiyon oranı açısından BAP'a göre daha etkin olduğu ortaya çıkmıştır

6) Sitokininlerin anter reaksiyon oranı üzerindeki etkisi genotiplere bağlı olarak önemli derecede farklılık göstermiştir. Araştırmada test edilen 5 nohut çeşidinden 4'ünde sitokinin çeşitleri anter reaksiyon oranında önemli bir farklılık yaratmamasına karşılık, Sezgin çeşidinde kinetin BAP'a göre önemli derecede daha yüksek anter reaksiyon oranı sağlamıştır.

7) Sitokinin çeşitlerinin anter reaksiyon oranı üzerindeki etkisi farklı oksin çeşidi x oksin konsantrasyonu kombinasyonlarında farklılık göstermiştir. 5 mg/l 2,4-D + BAP içeren ortamlarda % 9.5 olan anter reaksiyon oranı 5 mg/l 2,4-D + kinetin içeren ortamlarda % 12.5 olmuş ve ortama sitokinin olarak BAP yerine kinetin ilavesi anter reaksiyon oranında önemli derecede artışa neden olmuştur. Buna karşılık 10 mg/l 2,4-D içeren ortamlarda sitokinin çeşidi anter reaksiyon oranında önemli bir farklılık yaratmamıştır. 1 mg/l picloram içeren ortamlarda da sitokinin çeşidi anter reaksiyon oranında önemli bir farklılık yaratmamıştır. 2 mg/l picloram içeren ortamlarda ise kinetin BAP'a göre anter reaksiyon oranında istatistiksel olarak önemli derecede artışa neden olmuştur

8) Sitokinin konsantrasyonunun anter reaksiyon oranını istatistiksel olarak önemli derecede etkilediği saptanmıştır. Nitekim, sitokinin içermeyen ortamlarda %

3.8 olan anter reaksiyon oranı ortalaması, 0.5 mg/l sitokinin içeren ortamlarda %9 olarak gerçekleşmiş ve ortamda sitokinin bulunması anter reaksiyon oranında önemli derecede artışa neden olmuştur.

9) Sitokinin konsantrasyonunun etkisinin genotiplere bağlı olarak değiştiği saptanmıştır. Seçkin çeşidinde sitokinin konsantrasyonu anter reaksiyon oranında istatistiksel olarak önemli bir farklılık yaratmamasına karşılık, diğer çeşitlerde besi ortamına 0.5 mg/l sitokinin ilave edilmesi anter reaksiyon oranında sitokinin içermeyen ortama göre istatistiksel olarak önemli derecede artışa neden olmuştur.

10) Kültüre alınan anterlerden oluşan kallus ve embriyolar kültür başlangıcından 6-8 hafta Grawel ve ark. (2009) tarafından önerilen embriyo olgunlaştırma (EMM) ortamına aktarılmıştır. Söz konusu ortamda 4 hafta kalan kalluslarda embriyolar belirgin hale gelmiş ve bazı kalluslarda kök rejenerasyonu başlamıştır. Bunun yanında bazı kallus ve embriyolarda kararma ve ölüm ortaya çıkmıştır.

11) EMM ortamında 4 haftalık kültür sonunda, olgunlaşan embriyolar Grewal ve ark. (2009) tarafından önerilen bitki rejenerasyon ortamına (PRM) aktarılmıştır. Kallus ve embriyolar rejenerasyon ortamında 2-3 gün içinde yeşil renk almıştır. Ancak, rejenerasyon ortamına aktarılan kallus ve embriyolardan sürgün rejenerasyonu gerçekleşmemiş ve rejenerasyon ortamında 4 hafta kalan kallus ve embriyolar, yeni rejenerasyon ortamına aktarılmalarına rağmen herhangi bir gelişme göstermemişler ve siyahlaşarak ölmüşlerdir.

Araştırmada haploid bitki rejenerasyonunun gerçekleşmemiş olmasının bir çok nedeni olabileceği, araştırmada test edilen genotipler yanında kullanılan besi ortamının bileşimi, donör bitkilerin yetişme koşulları, anterlere kültür öncesi ve sonrası sıcak veya soğuk stresi uygulanması, anterlerin kültür koşulları gibi bir çok faktörün araştırmada test edilen nohut genotiplerinin anterlerinden haploid bitki rejenere olmamasının nedeni olabileceği vurgulanmıştır.

Araştırmadan elde edilen bulgulara dayanarak, Ülkemizdeki nohut ıslah

programlarında anter kültürü tekniğinden yararlanarak ıslah sürecinin kısaltılabilmesi için, öncelikle ülkemizde ıslah programlarında kullşanılabilecek nohut gen kaynaklarının anter kültürüne reaksiyon açısından test edilmesi ve anterlerden haploid bitki elde etme protokolünün optimizasyonuna yönelik olarak uygun besi ortamı, besi ortamı büyüme düzenleyicisi içeriği, kültür öncesi ve sonrası uygun stres yönteminin belirlenmesi ve anterler için uygun kültür koşullarının belirlenmesine yönelik araştırmaların yürütülmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

Abbo, S., Molina, C., Jungmann, R., Grusak, A., Berkovitch, Z., Reifen, R., Kahl, G., Winter, P. 2005. Quantitative trait loci governing carotenoid concentration and weight in seeds of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Theor Appl Genet 111:185–195.

Abdollahi, M.R. ve Rashidi, S. 2018. Production and conversion of haploid embryos in chickpea (*Cicer arietinum* L.) anther cultures using high 2,4-D and silver nitrate containing media. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 133:39–49.

Altaf, N. and Ahmad, M.S. 1986. Plant regeneration and propagation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) through tissue culture techniques. In: I. A. E. Agency (ed.) Nuclear Techniques and *in vitro* Culture for Plant Improvement. Vienna, Austria, PP:407-417.

Altaf, N. Ve Ahmad, M.S. 1990. II.2. Chichkpea (*Cicer arietinum* L.). Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 10, Legumes and Oilseed Crps I(ed.Y.P.S. Bajaj), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

Arya, I.D. and Chandra, N. 1989. Organogenesıs ın anther-derıved callus culture of cowpea [vıgna unguıculata (l.) walp]. Current Science, 58 (5): 257-259

Bajaj, Y. P. S., Singh, H.and Gosal, S. S. 1980. Haploid embryogenesis in anther cultures of pigeon-pea (*Cajanus cajan*). Theoretical and Applied Genetics, 58(3–4), 157–159.

Bajaj, Y.P.S. ve Gosal, S.S. 1987. Pollen embryogenesis and chromosomal variation in cultured anthers of chickpea. Chickpea Newslett 17:12-13

Bayliss, K., Wroth, J. And Cowling, W. 2004. Pro-embryos of Lupinus spp. produced from isolated microspore culture. Australian Journal of Agricultural Research - AUST J AGR RES. 55. 10.1071/AR03226.

Bermejo, C., Guindoni, M.F., Palacios, L.T., Cazzola, F., Gatti, I. and Cointry, E. 2020. Comparative androgenetic competence of various species and

genotypes within the genus *Pisum* L.. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 143:487–497.

Blaydes, D.F. 1966. Interaction of kinetin and various inhibitors in the growth of soybean tissue. Physiologia Plantarum 19: 748–753

Bhojwani, S.S., Dantu, P.K. 2010. Haploid plants. In: Davey MR, Anthony P (eds) Plant cell culture: essential methods. Wiley- Blackwell, Chichester, pp 60–78.

Bobkov, S.V. 2010. Isolated Pea Anther Culture. Russian Agricultural Sciences, 36 (6): 413–416.

Bobkov, S.V. 2014. Obtaining Calli and Regenerated Plants in Anther Cultures of Pea. Czech J. Genet. Plant Breed., 50(2): 123–129.

Burr, B., Burr, F.A., Thompson, K.H., Alberston, M.C. and Stubber, C.W. 1988. Gene mapping with recombinant inbreds in maize. Genetics 118:519–526.

Burucu, D. 2020. Ürün Raporu Nohut 2020. T.C. Gıda, Tarım Ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal Ekonomi Ve Politika Geliştirme Enstitüsü, Tepge Yayın No: 320 ISBN: 978-605-7599-47-6

Chase,S.S. 1952. Production of Homozygous Diploids of Maize from Monoploids. Agronomy Journal 44(5): 263-267.

Comai, L. 2014. Genome elimination: translating basic research into a future tool for plant breeding. PLoS Biol 12:e1001876.

Croser, J. S. 2002. Haploid and zygotic embryogenesis in chickpea (*Cicer arietinum L.*). PhD, The University of Melbourne, Melbourne, Australia.

Croser, J. S., and Lulsdorf, M. M. 2004. Progress towards haploid division in chickpea (*Cicer arietinum* L.), field pea (*Pisum sativum* L.) and lentil (*Lens culinaris* Medik.) using isolated microspore culture. In: *European Grain Legume Conference*, pp. 189. AEP, Paris, Dijon.

Croser, J., Lulsdorf, M., Davies, P., Wilson, J., Sidhu, P., Grewal, R. And Siddique, K. 2005. Haploid embryogenesis from chickpea and field pea–progress towards a routine protocol. Proceedings of the Australian branch of the IAPTC&B, pp. 71–82.

Croser,J.S, Lülsdorf, M.M., Grewal, R.K., Usher, K.M., Siddique, K.H.M. 2011. Isolated microspore culture of chickpea (*Cicer arietinum* L.): induction of androgenesis and cytological analysis of early haploid divisions. In Vitro Cell Dev Biol Plant 47:357–368.

cultured anthers of mulberry *(Morns indica).* Plant Cell Tiss.Org.Cult. 44(2): 143-147.

Çölgecen, H., Koca, U. and Toker, G. 2011. Influence of different sterilization methods on callus initiation and production of pigmented callus in Arnebia densifl ora Ledeb. Turk J Biol 35: 513-520.

Davies, P. 2015. Final report of Cell culture technology to advance disease resistance breeding in pulses, attachment: A Summary of pulse anther culture (AC) and isolated microspore culture (IMC) experiments. https://grdc.com.au/research/reports/report?id=267.

De Moraes, A.P., Bonadese-Zanettini, M.H., Callegari-Jacques S.M. and Kaltchuk-Santos, E. 2004.Effect of temperature shock on soybean microspore embryogenesis. Brazilian Archives of Biology and Technology. 47:537-544.

Deswal, K. 2018. Progress and opportunities in double haploid production in lentil (*Lens culinaris* Medik.), soybean (*Glycine max* L. Merr.) and chickpea (*Cicer arietinum* L.) . Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 7(3): 3105-3109.

Ercan G., Kaya M., Çiftçi C.Y., 2005. Nohutun dünya ve Türkiye ekonomisindeki yeri. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi. 9 (1): 19-29.

Eser, 1976. Nohut (Cicer arietinum L.)'ta Başlıca Bitki Özelliklerinin Kalıtım Değerleri : Bu Özellikler ile Bitki Verimi Arasındaki İlişkiler ve Ascochyta rabiei (Pass .)'ye Dayanıklılığın Kalıtımı . A . Ü . Ziraat Fakültesi Yayınları : 620 . 40 s .

FAO, 2021. Crops. www.fao.org/faostat. (Erişim tarihi 17.07.2021)

Gamborg, O., Miller, and Ojima, K.1968. Nutrient requirement suspensions cultures

of soybean root cells. Exp. Cell Res., 50, 151-158.

Gatti, I., Guindon, F., Bernejo, C., Esposito, A. and Cointry, E. 2016. In vitro tissue culture in breeding programs of leguminous pulses: use and current status. Plant Cell Tiss Organ Cult 127:543–559.

Geiger, H.H. and Gordillo, G.A. 2009. Doubled Haploıds In Hybrıd Maıze Breedıng. Maydica 54: 485-499.

Germana, M.A., 2006. Double haploid production in fruit crops. Plant cell Tissue Organ, 86:131-146.

Grewal, R.K., Lulsdorf, M., Croser, J., Ochatt, S., Vandenberg, A. ve Warkentin, T.D. 2009. Doubled-haploid production in chickpea (*Cicer arietinum* L.): role of stress treatments. Plant Cell Reports. 28:1289-1299.

Gosal, S.S. and Bajaj, Y.P.S. 1988. Pollen embryogenesis and chromosomal variation in anther of three food legumes – Cicer arietinum, Pisum sativum and Vigna mungo. Sabrao Journal 20, 51–58.

Guha, S. and Maheshwari, S.C. 1964. *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura.* Nature 204:497.

Gupta, S., Ghosal, K. K., and Gadgil, V. N. 1972. Haploid tissue culture of Triticum aestivum var. Sonalika and Pisum sativum var. B22. Indian Agric. 16: 277–278.

Gupta, S., 1975. Morphogenetic response of haploid callus tissue of Pisum sativum (var. B22). Indian Agriculture 19, 11–21.

Hatipoğlu, R. 2008. Bitki Biyoteknolojisi. Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Gelen Yayın No: 190, ders Kitapları Yayın No: A-58, 176 S, Adana.

Helbaek, H. 1970. The plant husbandry at Hacillar. In: Mellaart J. (ed) Excavation at Hacillar. Edinburg University Press, Gerald Duckworth, London, UK, pp 189–244.

Herman, E.B. 2017. Plant tissue culture contamination: challenges and opportunities. Acta Hortic. 1155, 231-238.

Hesami, M, Naderi, R and Tohidfar, M. 2019. Modeling and Optimizing in vitro

Sterilization of Chrysanthemum via Multilayer PerceptronNon-dominated Sorting Genetic Algorithm-II (MLP-NSGAII). Front. Plant Sci. 10:282. doi: 10.3389/fpls.2019.00282.

Huda, S., Islam, R., Bari, M.A. and Asaduzzaman, M., 2001. Anther culture of chickpea. International Chickpea and Pigeonpea Newsletter 8, 24–26.

Huda, S.,2003. et.al., Shoot Differentiation from Cotyledon Derived Callus of Chickpea (Cicer arietinum L.) Plant Tissue Cult. 13:1, 53-59, 2003.

Kaplan, N., İslami, A. ve Ekbiç, H.B. 2020. Çakıldak fındık çeşidinin in vitro sürgün ucu kültürü ile çoğaltılması. Akademik Ziraat Dergisi 9(2): 193-200.

Kasha, K.J., Kao, K.N., 1970. High frequency haploid production in barley (Hordeumvulgare L.). Nature 225, 874–876.

Kasha, K.J. and Maluszynski, M. 2003. Production of doubled haploids in crop plants. An introduction. In: Doubled Haploid Production in Crop Plants, M. Maluszynski, K.J.Kasha, B.P.Forster, ISzarejko (edts), PP: 1-4. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Keller, W. A. and Ferrie, A. M. R. 2002. Development of haploid production technology applicable for genetic improvement of lentils. ADF project No. 98000297.

Kennedy, B., Collard, B., Brouwer, J.B., Taylor, P. and Pans, E. 2002. Doubled Haploid Production in Chickpea via Anther Culture. In: 'Plant Breeding for the 11th Millennium' JA McComb (Ed.) Proceedings of the 32th Australasian Plant Breeding Z " 3 Conference, Perth,W . Australia, 15-20111 September 2002. pp. 84-87 (Australasian Plant Breeding Assoc. Inc.).

Khan, S.K. ve Ghosh, P.D.,1983. In vitro induction of androgenesis and organogenesis in *Cicer arietinum* L. Curr Sci 52(18):891-893.

Kozak, K., Galek, R., Waheed, M.T. and Sawicka-Sienkiewicz, E. 2012. Anther culture of *Lupinus angustifolius*: callus formation and the development of multicellular and embryo-like structures. Plant Growth Regul 66:145–153.

Kumar, O. and Choudhary, M. 2020. Double Haploid: An Overview. Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci. 9(01): 1012-1029.

Kupicha, F. K. 1977. The delimitation of the tribe *Vicieae* (Leguminosae) and the relationships of *Cicer* L. *Bot. J. Lin. Soc.* 74: 131–162.

Kuppu, S., Ron, M., Marimuthu, M.P.A., Li, G., Huddleson, A., Siddeek, M.H., Terry, J., Buchner, R., Shabek, N., Comai, L. and Britt, Aç.B. 2020. A variety of changes, including CRISPR/Cas9-mediated deletions, in CENH3 lead to haploid induction on outcrossing. Plant Biotechnol J. 18(10):2068-208.

Ladizinsky, G. and Adler, A. 1976. The origin of chickpea *Cicer arietinum* L. *Euphytica* 25: 211–217.

Leifert, C. and Cassells, A.C. 2001. Microbial Hazards in Plant Tissue and Cell Cultures In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant 37,(2): 133-138.

Lulsdorf, M.M, Croser J.S. and Ochatt, S. 2011. Androgenesis and doubledhaploid production in food legumes. Chapter 11. In: Pratap A, Kumar J (eds) Biology and breeding of food legumes. CABI,Oxfordshire, pp 336–347.

Lulsdorf, M., Yuan, H. Y., Slater, S., Vandenberg, A., Han, X., and Zaharia, L. I. 2012). Androgenesis-inducing stress treatments change phytohormone levels in anthers of three legume species (Fabaceae). Plant Cell Reports, 31(7): 1255–1267.

Malhotra, R.S. ve Singh, K.B. 1986. Natural cross pollination in chickpea. Int Chickpea Newslett 14:4-5.

Mallikarjuna, N., Coyne, C., Cho, S., Rynearson, S., Rajesh, P.N., Jadhav, R.J. and Muehlbauer, F.J. 2011. Cicer, Chapter 4, Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, Legume Crops and Forages (C.Kole, ed), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, PP: 63-82.

Millán,T., Madrid, E., Cubero, J.I., Amri, M., Castro, P. and Rubio, J. 2015. Chickpea. In: Handbook of Plant Breeding Vol 10 Grain Legumes, A.M. de Ron (Edt.), pp: 85-109. Springer, New York

Muehlbauer, F. J. and Singh, K. B. 1987. Genetics of chickpea. **In**: *The Chickpea*.

pp. 99–125. Saxena, M. C. and Singh, K. B., Eds., CAB International Publication, Wallingford.

Munoz-Florez, L. C., & Baudoin, J. P. (1994a). Anther culture in some Phaseolus species. In W. M. Roca, J. E. Mayer, C. M. A. Pastor and M. J. Tohme (Eds.), International Scientific Meeting Phaseolus Beans Advanced Biotechnology Research Network (2:1983: Cali, Colombia). Phaseolus beans advanced biotechnology research network: Proceedings (pp. 205–212). Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

Munoz-Florez, L. C., and Baudoin, J. P. 1994b. Influence of the cold pretreatment and the carbon source on callus induction from anthers in Phaseolus. Bean Improvement Cooperative Annual Report (USA), 37, 129–130.

Munoz, L.C. and Baudoin, L.P. 2002. Improvement of in vitro induction of androgenesis in Phaseolus beans (P. *vulgaris L.* and *P. coccineus* L.). Acta Agronomica 51 (3/4): 81-87.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, Physiol. Plant., 15: 473-497.

Ochatt, S., Pech, C., Grewal, R., Conreux, C., Lülsdorf, M., Jacas, L. 2009. Abiotic stress enhances androgenesis from isolated microspores of some legume species (Fabaceae). J Plant Physiol 166:1314– 1328

Odutayo, O. I. , Oso, R. T., Akinyemi, B. O. and Amusa, N. A. 2004. Microbial contaminants of cultured Hibiscus cannabinus and Telfaria occidentalis tissues. African Journal of Biotechnology 3 (9): 473-476

Ormerod, A.J. and Caligari, P.D.S.. 1994. Anther and microspore culture of Lupinus albus in liquid culture medium. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 36: 227-236.

Özer, G., 2020. Farklı Nohut (*Cicer arietinum L.*) Genotiplerinde Çeşit Islahına Yönelik Katlanmış Haploid Bitki Eldesi Üzerine Araştırmalar.

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalı. Ağustos 2020, 97 sayfa.

Panchangam, S.S., Mallikarjuna, N.G, Pooran, M., Suravajhala, P.2014. Isolated microspore culture of chickpea (*Cicer arietinum* L.): induction of androgenesis and cytological analysis of early haploid divisions, indian Journal of Experimental Biology, 2014; 52:181-188.

Pandey, K.K. 1973. Theory And Practıce Of Induced Androgenesıs. Newv Phytol. 72: 1129-1140.

Peters, J., Crosromo, O. And Sharp, W. 1977. Haploid callus cells from anthers of Phaseolus vuulgaris. Phytomorphol. 27: 79-85.

Pratap, A. and Kumar, J. 2011. History Origin and ,Evolution. In: History and Breeding of Food Legumes, A.. Pratap ve J. Kumar (eds), P:1-18, CABI, Oxfordshire.

Pratap, A., Prajapati, U., Singh, C.M., Gupta, S., Rathore, M., Malviva, N., Tomar, R., Gupta, A.K., Tripathi, S. and Singh, N. P. 2018. Potential, constraints and applications of in vitro methods in improving grain legumes. Plant Breeding. 137:235–249.

Rashidi S. H., Abdollahi, M.R, Sarikhani, H., Moosavi, S.S. 2019. Investigation of the Effect of Centrifugation and Electrical Shock Pretreatments on the Androgenesis Efficiency in Chickpea (*Cicer arientinum* L.) Anther Culture Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(2): 173-181.

Reddy, M.V., Singh, K.B.,1984. Evaluation of a World Collection of Chickpea Germ Plasm Accessions for Resistance to Ascochyta Blight . Plant Disease.68:900-901.

Reddy, M. V., Kabbabeh , S ., 1985. Pathogenic Variability in Ascochyta rabiei (Pass.) Lab. in Syria and Lebanon. Phytopath. Medit.24: 265-266.

Reddy, V.D. and Reddy, G.M. 1996. In vivo production of haploids in chickpea (*Cicer arietinum* L.). J. Genet. And Breed. 51:29-32.

Ribalta, F. 2014. Accelarating the generation of homozygosity and genom fixation in Pea (*Pisum sativum* L.). PhD thesis. Centre for legumes in Mediterranean Agriculture Scholl of Plant Biology, Faculty of Science, The University of Western Australia, 135 P.

Rodriques, L.R., Forte, B.C., Oliveira, J.M.S., Mariath, J.E.A. and Bodanes-Zanettini, M.H. 2004. Effects of light conditions and 2,4-D concentration in soybean anther culture. Plant Growth Regulation 44: 125–131.

Saraf C.S, Rupela O.P, Hegde D.M, Yadav R.L, Shivkumar B.G,Bhattarai S, Razzaque M.A, Sattar M.A. 1998. Biological nitrogen fixation and residual effects of winter grain legumes in rice and wheat cropping systems of the Indo-Gangetic plain. In: Kumar JVDK, Johansen C, Rego TJ (eds) Residual effects of legumes in rice and wheat cropping systems of the Indo-Gangetic plain. Oxford and IBH Publishing, New Delhi, India, pp 14–30.

Silva T.D. 2012. Microspore embryogenesis. In: Sato KI (ed) Embryogenesis, InTech.http://www.intechopen.com/books/embryogenesis/microspore-embryogenesis. (Erişim tarihi: 16.07.2021)

Singh, C.R. 2018. Review on Problems and its Remedy in Plant Tissue Culture. Asian Journal Of Bioligical Sciences 11(4): 165-172.

Skrzypek, E., Czyczyło-Mysza, I., Marci_nska, I., and Wez dzony, M. 2008. Prospects of androgenetic induction in Lupinus spp. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 94(2), 131–137.

Smykal, P., Coyne, C.J., Ambrose, M. J., Maxted, N., Schaefer, H., Blair, M.W., Berger, J., Green, S.L., Nelson, M.N., Besharati, N., Vymyslicky, T., Toker, C., Saxena, R., Roorkiwal, M., Pendey, M.K., Hu, J., Li, Y.H., Wang, L.X., Guo, Y., Quiu, L.J., Redden, R.J. and Varshney, R.K. 2015. Legume Crops Phylogeny and Genetic Diversity for Science and Breeding. Critical Reviews in Plant Sciences, 34:1-3, 43-104,

Szarejko I., Forster, B.P. 2007. Doubled haploidy and induced mutation.Euphytica 158:359–370.

Taghizadeh, M. and Solgi, M. 2014. The Application of Essential Oils and Silver Nanoparticles for Sterilization of Bermudagrass Explants in in vitro Culture. International Journal of Horticultural Science and Technology 1 (2):131-140.

Tek,A.L., Stupar, R.M. and Nagaki, K. 2015. Modification of centromere structure: a promising approach for haploid line production in plant breeding. Turk J Agric. For. 39:557–562.

Thomas, W.T.B., Forster, B.P., and Gertsson, B. 2003. Doubled haploids in breeding. In: Doubled Haploid Production in Crop Plants, M. Maluszynski, K.J.Kasha, B.P.Forster, ISzarejko (edts), PP: 337-349. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands,

TMO, 2020. 2019 Yılı Bakliyat Sektör Raporu, Toprak Mahsulleri Ofisi Genel Müdürlüğü, Ankara.

Toker, C. 2009. A note on the evolution of kabuli chickpeas as shown by induced mutations in *Cicer reticulatum* Ladizinsky. *Genet. Res. Crop Evol.* **56**: 7–12.

TÜİK, 2021. Kuru baklagiller üretim istatistikleri. www.tuik.gov.tr (Erişim tarihi 17.07.2021).

UBK, 2014. Ulusal Baklagil Konseyi, Baklagil Raporu www.ubk.org.tr.

Van der Maesen, L.J.G. 1987. Origin, history and taxonomy of chickpea. In: Saxena MC, Singh RB (eds) The chickpea. CABI, Wallingford, UK, pp 139–156.

Varshney, R. K., Song, C., Saxena, R. K., Azam, S., Yu, S., Sharpe, A. G., Cannon, S., Baek, J., Rosen, B. D., Tar'an, B.,Millan, T., Zhang, X., Ramsay, L. D., Iwata, A.,Wang, Y., Nelson,W., Farmer, A. D., Gaur, P.M., Soderlund, C., Penmetsa, R. V., Xu, C., Bharti, A. K., He,W.,Winter, P., Zhao, S., Hane, J. K., Carrasquilla-Garcia, N., Condie, J. A., Upadhyaya, H. D., Luo, M. -C., Thudi,M., Gowda, C. L. L., Singh, N. P., Lichtenzveig, J., Gali, K. K., Rubio, J., Nadarajan, N., Dolezel, J., Bansal, K. C., Xu, X., Edwards, D., Zhang, G., Kahl, G., Gil, J., Singh, K. B., Datta, S. K., Jackson, S. A., Wang, J., and Cook, D. R. 2013. Draft genome sequence of chickpea (*Cicer arietinum*) provides a resource for trait improvement. *Nat. Biotech.* **31**: 240–246.

Vessal, S. R., Bagheri, A. and Safarnejad, A. 2002. The possibility of in vitro haploid production in chickpea (Cicer arietinum L.). JWSS-Isfahan University of Technology, 6(2), 67–76.

Wang, L., Du, Y., Mahbubur, R., Tang, B., Fan, L.J. and Kilaru, A. 2018. Establishment of an efcient in vitro propagation system for Iris sanguinea. Scientific REporTs | (2018) 8:17100 | DOI:10.1038/s41598-018-35281.-y

Wang, S., Jin, W. W. And Wang, K. 2019. Centromere histone H3-and phospholipase-mediated haploid induction in plants. Plant Methods 15:42.

Williams, P.C. ve Singh, U. 1987. The chickpea – nutritional quality and the evaluation of quality in breeding programs. In: Saxena MC, Singh KB (eds) The chickpea. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp 329–356.

Zhao, G., Liu, Y., and Li, J. 1998. Germination of embryo in soybean anther culture. Chinese Sci. Bull. 43: 1991–1995.

Zohary, D. and Hopf, M. 2000. Domestication of plants in the old world, 3rd edn. Oxford University Press, New York, USA.

ÖZGEÇMİŞ

5 yıllık eğitimini Oymaklı Köyü İlköğretim Okulu'nda tamamladı. Orta eğitimini Atatürk Yatılı İlköğretim Bölge Okulu'nda tamamladı. Lise eğitimini Gerger Çok Programlı Lisesi'nde tamamladı. 2014 yılında Ç.Ü. Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü'ne girdi. 2018 yılında lisans eğitimini tamamladıktan sonra aynı yıl Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı.