

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

**FARKLI NOHUT (*CICER arietinum* L.) GENOTİPLERİNDE ÇEŞİT ISLAHINA  
YÖNELİK KATLANMIŞ HAPLOID BITKİ ELDESİ ÜZERİNE  
ARAŞTIRMALAR**

**Gözde ÇELİK ÖZER**

**TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

**ANKARA  
2020**

**Her hakkı saklıdır**

## ÖZET

Doktora Tezi

### FARKLI NOHUT (*Cicer arietinum* L.) GENOTİPLERİNDE ÇEŞİT ISLAHINA YÖNELİK KATLANMIŞ HAPLOİD BİTKİ ELDESİ ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

Gözde ÇELİK ÖZER

Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Cemalettin Yaşar ÇİFTÇİ

Bu çalışmada, nohut ıslah programlarında kullanılmak ve antraknoza dayanıklı çeşit geliştirmek amacı ile farklı genotipler kullanılarak yapılan melezleme sonucunda elde edilen F<sub>2</sub> kademesindeki bitkiler ve ticari nohut çeşitleri ile yüksek frekansta katlanmış haploid bitki elde edilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada tarla denemeleri Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü'nün Araştırma ve Uygulama Çiftliği İkizce deneme alanında, sera denemeleri ve doku kültürü çalışmaları ise Biyoteknoloji Araştırma Merkezinde 2017-2019 yılları arasında yürütülmüştür. Tarla ve sera koşullarında yetişen 15 nohut genotipinde, farklı sürelerde ön soğuk uygulamaları (+ 4 °C de 0, 4, 7 gün), farklı kallus teşvik ortamları ve çeşitli oksin ve sitokinin kombinasyonlarını içeren sürgün teşvik ortamları kullanılarak yüksek frekansta haploid bitkicikler elde edilmeye çalışılmıştır. Araştırma sonuçlarına göre; ön soğuk uygulamasının anterler üzerinde kallus oluşumu üzerine olumlu etki yaparken, istenen tipte en yüksek embriyogenik kallus oluşumu, tüm genotiplerde 4 gün süreyle uygulanan ön soğuk uygulamasında elde edilmiştir. Tarla koşullarında yetişen donör bitkilerden alınan tomurcuklardan gelişen embriyonik kallus oluşumu en fazla EDM 2 no'lu ortamında, olgunlaşmış embriyonik kallus oluşumu ise EMM 2 no'lu, embriyonik kalluslardan sürgün rejenerasyonu en fazla PRM 3 ortamında izlenmiştir. Embriyonik kallus ve sürgün oluşumu bakımından genotipler arasında ciddi bir farklılık saptanırken, en fazla embriyonik kallus F<sub>2</sub> 8 popülasyonunda (2,68 adet), en iyi olgunlaşmış embriyonik kallus F<sub>2</sub> 1 popülasyonunda (2,54 adet) ve en çok sürgün oluşumu F<sub>2</sub> 1 (2,11 adet) popülasyonunda, diğer genotiplere göre, tüm kallus ve sürgün rejenerasyon ortamlarında öne çıktığı görülmüştür. Oksin kaynağı olarak 2,4-D'nin AgNO<sub>3</sub> ile birlikte kullanıldığında embriyonik kallus oluşumunu teşvik ettiği, sürgün rejenerasyon ortamında ise 1,00 mg/ L BAP + 0,03 mg/ L NAA kombinasyonu içeren modifiye edilmiş MS besin ortamının uygun olduğu saptanmıştır. Çalışma sonucunda anterlerden gelişen embriyonik kalluslardan sürgün rejenerasyonları elde edilmiş, elde edilen sürgünlerin ploidi düzeyleri belirlenmiş %50 oranında diploid bitki elde edilmiştir. Farklı oksin tipi ve konsantrasyonlarını içeren besin ortamlarındaki köklendirme çalışmaları devam etmektedir.

**Ağustos 2020, 97 sayfa.**

**Anahtar Kelimeler:** Nohut, popülasyon, anter kültürü, double haploid, rejenerasyon

## ABSTRACT

Ph. D. Thesis

### STUDIES ON PRODUCTION OF DOUBLE HAPLOID PLANT USING DIFFERENT CHICKPEA (*Cicer arietinum* L.) CULTIVARS AND HYBRID POPULATIONS FOR BREEDING OF CHICKPEA

Gözde ÇELİK ÖZER

Ankara University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Field Crop Department

Supervisor: Prof. Dr. Cemaletin Yaşar ÇİFTÇİ

With this study, it was aimed to obtain to double haploid plant production in order to resistance to ascochyta blight disease in F<sub>2</sub> level populations and 4 different chickpea varieties. In this study, the reactions of plants grown in different environmental conditions to anther culture were investigated. In this study, field, greenhouse and tissue culture studies were carried out between 2017-2019. The results obtained showed that the rate of callus and shoot formation in donor plants grown in field conditions was higher than those grown in controlled (greenhouse) conditions. In this study, using 15 different chickpea genotypes, grown in field and greenhouse conditions, pre-cold applications at different times (0, 4, 7 days at + 4 °C), containing various auxin and cytokine combinations callus promoting and shoots combinations environment to be tried obtained high frequency haploid plants. According to the research results; while the pre-cold application had a positive effect on callus formation on the anthers, the highest embryogenic callus formation of the desired type was obtained in the pre-cold application applied for 4 days in all genotypes. The formation of the highest embryonic callus developed from the buds taken from the donor plants grown in the field conditions was observed in the medium of EDM 2 and the formation of the highest mature embryonic callus was observed in the medium of EMM 2, and the most shoot regeneration from the embryonic callus was observed in the medium PRM 3. While there is a significant difference between genotypes in terms of embryonic callus and shoot formation, most embryonic callus is in F<sub>2</sub> 8 population (2,68) the best matured embryonic callus is in F<sub>2</sub> 1 population (2.54) and most shoot formation in the F<sub>2</sub> 1 (2.11) population. When used together with AgNO<sub>3</sub> as a source of auxin, 2,4-D promotes embryonic callus formation, in the shoot regeneration environment, it was determined that the modified MS nutrient medium containing BAP and NAA combination is suitable. As a result of the study, shoot regenerations were obtained from embryonic calluses developed from anthers, ploidy levels of the shoots obtained were determined, rooting studies in nutrient media containing different auxin types and concentrations continue.

**August 2020, 97 pages.**

**Key Words:** Chickpea, population, anther culture, double haploid, regeneration

## ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Islah çalışmaları doku kültürü teknikleri ile yürütüldüğünde yeni bir çeşitin ortaya çıkış süresi azalmaktadır. Dünyada, baklagillerde anter kültürü tekniğinden faydalanılarak yürütülen başarılı ıslah çalışmaları mevcuttur. Buna rağmen ülkemizde nohutta bu teknikten faydalanılarak yürütülen ıslah çalışması bulunmamaktadır. Şimdiye kadar nohutta anter kültürü yöntemi kullanılarak sonuca ulaşılammış olması ve klasik nohut ıslah yöntemleri ile yürütülen çalışmaların çok fazla zaman ve emek gerektirmesi bu konuda çalışılması gerektiği fikrini doğurmuştur.

Doktora eğitimim boyunca bilgisini ve tecrübesini benden esirgemeyen, her koşulda desteğini gördüğüm Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Cemalettin Yaşar ÇİFTÇİ'ye sonsuz teşekkürü borç bilirim. Takıldığım her konuda bilgileri ile beni aydınlatan, çalışmama ışık tutan, kıymetli hocalarım Prof. Dr. Serkan URANBEY'e ve Doç.Dr. Sevil SAĞLAM YILMAZ'a çok müteşekkirim. Bu konuda çalışmamı destekleyen, yaklaşık 10 yıldır bünyesinde çalıştığım Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ne teşekkürü borç bilirim. Birçok konuda olduğu gibi bu çalışma süresince de yardımını ve desteğini gördüğüm yemeklik tane baklagil ıslahçısı Dr. Abdulkadir AYDOĞAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Tarla çalışmalarında emeği geçen yine aynı birimde görev yapan Elif ATASAYAR'a ve Havva Vildan KILINÇ'a ve Biyoteknoloji Araştırma Merkezinde yürüttüğüm laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımını ve desteğini gördüğüm Dr. Cuma KARAOĞLU'na çok teşekkür ederim. İstatistik analizlerimi gerçekleştirirken desteğini gördüğüm Sinan AYDOĞAN'a teşekkürü borç bilirim.

Tüm hayatım boyunca her koşulda desteklerini esirgemeyen sevgili anneciğime, babacığım ve kardeşim Özge'ye sonsuz minnettarım. İhtiyaç duyduğum her an sevgisiyle güç veren, her koşulda bana güvenen, beni motive eden, bu hayattaki en büyük şansım olan eşim Onur ÖZER ile en değerli varlıklarım, canım kızlarım Öykü ÖZER'E ve Beste ÖZER'E sonsuz teşekkürler.

Bu çalışma Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (TAGEM) tarafından akademik kariyer projesi kapsamında (TBAD/18/A7/P3/317) desteklenmiştir.

Gözde ÇELİK ÖZER  
Ankara, Ağustos 2020

## İÇİNDEKİLER

<b>TEZ ONAY SAYFASI</b>	
<b>ETİK.....</b>	<b>i</b>
<b>ÖZET.....</b>	<b>ii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>iii</b>
<b>ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....</b>	<b>iv</b>
<b>SİMGELER DİZİNİ.....</b>	<b>vii</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ.....</b>	<b>viii</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ.....</b>	<b>xi</b>
<b>1.GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Dünya’da baklagillerin genel durumu.....</b>	<b>4</b>
<b>2.2 Dünya’da nohut genel durumu.....</b>	<b>4</b>
<b>2.3 Türkiye’de baklagillerin genel durumu.....</b>	<b>5</b>
<b>2.4 Türkiye’de nohut genel durumu.....</b>	<b>5</b>
<b>2.5 Doku kültürü ve haplodizasyon teknikleri.....</b>	<b>8</b>
<b>2.6 Nohutta haplodizasyon çalışmaları.....</b>	<b>12</b>
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1 Bitki Materyali.....</b>	<b>19</b>
<b>3.2 Yöntem.....</b>	<b>23</b>
<b>3.2.1 Anter kültürü çalışmaları aşamaları.....</b>	<b>23</b>
<b>3.2.2 Donör bitkilerin tarla koşullarında yetiştirilmesi.....</b>	<b>24</b>
<b>3.2.3 Donör bitkilerin sera koşullarında yetiştirilmesi.....</b>	<b>24</b>
<b>3.2.4 Uygun tomurcuk safhasının tespiti ve tomurcukların hasat edilmesi... </b>	<b>26</b>
<b>3.2.5 Anterlere ön soğuk uygulaması.....</b>	<b>28</b>
<b>3.2.6 Büyüme düzenleyici hormon stok çözeltilerinin muhafazası.....</b>	<b>28</b>
<b>3.2.7 Tomurcukların yüzey sterilizasyonu.....</b>	<b>29</b>
<b>3.2.8 Anterlerin besin ortamına aktarılması ve kurulan denemeler.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2.9 Embriyonik kallus geliştirme ortamı (EDM) .....</b>	<b>32</b>
<b>3.2.10 Embriyonik kallusları olgunlaştırma ortamı (EMM).....</b>	<b>35</b>
<b>3.2.11 Sürgün rejenerasyonu ortamı (PRM) .....</b>	<b>38</b>
<b>3.2.12 Köklendirme ortamı (R) .....</b>	<b>41</b>
<b>3.2.13 Ploidi düzeyinin belirlenmesi.....</b>	<b>41</b>
<b>3.3 İstatistiksel Değerlendirme.....</b>	<b>42</b>
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</b>	<b>43</b>
<b>4.1. Tarla koşullarında yetiştirilen donör bitkilerde embriyonik kallus oluşumu .....</b>	<b>43</b>
<b>4.2 Sera koşullarında yetiştirilen donör bitkilerde embriyonik kallus oluşumu.....</b>	<b>48</b>

<b>4.3 Tarla koşullarında yetiştirilen donör bitkilerde olgunlaşmış embriyonik kallus oluşumu.....</b>	<b>53</b>
<b>4.2.2 Sera koşullarında yetişen donör bitkilerde olgunlaşmış embriyonik kallus oluşumu.....</b>	<b>58</b>
<b>4.3.1 Tarla koşullarında yetişen donör bitkilerde olgunlaşmış embriyonik kallustan sürgün rejenerasyonu oluşumu.....</b>	<b>63</b>
<b>4.3.2 Sera koşullarında yetişen donör bitkilerde olgunlaşmış embriyonik kallustan sürgün rejenerasyonu oluşumu.....</b>	<b>72</b>
<b>4.4 Köklendirme ortamlarında elde edilen sonuçlar.....</b>	<b>72</b>
<b>4.5 Gelişen sürgünlerde ploidi analizi.....</b>	<b>74</b>
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>77</b>
<b>6. SONUÇ.....</b>	<b>83</b>
<b>7. ÖNERİLER.....</b>	<b>86</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>88</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>95</b>

## SİMGELER DİZİNİ

g	Gram
mg	Mili gram
°C	Santigrad derece
l	Litre
ml	Mili litre
µl	Mikro litre
cm	Santimetre
mm	Milimetre

### **Kısaltmalar**

BAP	6- Benzylaminopurine
EDM	Embriyo Geliştirme Ortamı
EMM	Embriyo Olgunlaştırma Ortamı
F	F test
2,4-D	2,4 - Diklorofenoksi Asetikasit
GA <sub>3</sub>	Giberellik Asit
IBA	Indol Butirik Asit
Kn	Kinetin
MS	Murashige ve Skoog
NAA	Naftalin Asetik Asit
PRM	Bitki Rejenerasyon Ortamı
TDZ	Thidiazuron
IAA	Indol Asetik Asit
Kg /da	Kilogram / dekar
Ha	Hektar

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1 Gökçe çeşidi tohumlarına ait görünüm.....	21
Şekil 3.2 Uzunlu 99 çeşidi tohumlarına ait görünüm.....	21
Şekil 3.3 Er 99 çeşidi tohumlarına ait görünüm.....	22
Şekil 3.4 Dikbaş çeşidi tohumlarına ait görünüm.....	23
Şekil 3.5 Çiçeklenme döneminde materyallerin genel bir görünümü.....	24
Şekil 3.6 Materyallerin 1:1:1 (toprak: perlit: torf) içeren saksılara ekimi.....	25
Şekil 3.7 Sera koşullarında farklı tarihlerde ekilen ve gelişen bitkilerin görünümü.....	25
Şekil 3.8 Sera koşullarında yetiştirilen materyallerin fide ve çiçeklenme dönemindeki görünümü.....	26
Şekil 3.9 Nohutta mikrospor gelişme safhaların şematik görüntüsü.....	27
Şekil 3.10 Antesis devresindeki nohut çiçek tomurcuğunun görünümü.....	27
Şekil 3.11 Tek çekirdekli mikrospor safhasında olan tomurcukların araziden toplanması.....	28
Şekil 3.12 Hormon stok çözeltilerinin ve besin ortamlarının hazırlanması.....	29
Şekil 3.13 Tomurcukların yüzey sterilizasyon .....	30
Şekil 3.14 Besin ortamlarının filtre sterilizasyon.....	31
Şekil 3.15 Yüzey sterilizasyonu yapılmış tomurcuklardan anterlerin izole edilmesi.....	31
Şekil 3.16 Steril koşullarda anterlerin izole edilmesi.....	32
Şekil 3.17 Embriyonik kallus geliştirme ortamlarında anterlerin gelişim aşamalarının takibi.....	35
Şekil 3.18 EDM besin ortamında gelişen embriyonik kallusların PRM rejenerasyon ortamına aktarılması.....	38
Şekil 3.19 Ploidy analyser cihazı ile sürgünlerde ploidi düzeylerinin belirlenmesi.....	42
Şekil 4.1 Kallus teşvik ortamında (EDM 2) anterlerin görünümü ve kallus oluşumu.....	45
Şekil 4.2 Farklı EDM ortamları ve farklı nohut genotiplerinde kültüre alındıktan 3 hafta sonra embriyonik kallus oluşumu.....	45

Şekil 4.3 F <sub>2</sub> 8. Popülasyonunda, EDM 2 ortamında, kültüre alındıktan 4 hafta sonra embriyonik kallus oluşumu.....	48
Şekil 4.4 Sera koşullarında yetişen F <sub>2</sub> 6 popülasyonunda, EDM 2 ortamında, kültüre alındıktan 3 hafta sonra embriyonik kallus oluşumu.....	50
Şekil 4.5 EDM 2 no'lu ortamdan EMM 3 ortamına aktarıldıktan 1 hafta sonra F <sub>2</sub> kademesindeki 6. popülasyona ait olgunlaşmış globular safhadaki embriyonik kallus.....	57
Şekil 4.6 EDM 3 no'lu ortamdan EMM 2 no'lu ortama aktarıldıktan 3 hafta sonra F <sub>2</sub> kademesindeki 2 popülasyona ait kalp safhasındaki embriyonik kallus.....	57
Şekil 4.7 Farklı EMM ortamları ve farklı nohut genotiplerinde kültüre alındıktan 2 hafta sonra olgunlaşmaya başlamış embriyonik kalluslar.....	62
Şekil 4.8 F <sub>2</sub> kademesindeki 4. popülasyonda, EMM 2 no'lu ortamında, kültüre alındıktan 3 hafta sonra globüler embriyonik kallus oluşumu.....	62
Şekil 4.9 PRM 3' te kültüre alındıktan 16 hafta sonra F <sub>2</sub> kademesindeki 5. popülasyonun embriyonik kallus oluşturan anterlerinden sürgün rejenerasyonu.....	64
Şekil 4.10 PRM 7' de kültüre alındıktan 12 hafta sonra F <sub>2</sub> kademesindeki 3. popülasyonun embriyonik kallus oluşturan anterlerinden sürgün rejenerasyonu.....	65
Şekil 4.11 PRM 6' de kültüre alındıktan 10 hafta sonra F <sub>2</sub> kademesindeki 6. popülasyonun embriyonik kallus oluşturan anterlerinden sürgün rejenerasyonu.....	67
Şekil 4.12 PRM 12' de kültüre alındıktan 8 hafta sonra Gökçe çeşidinin embriyonik kallus oluşturan anterlerinden sürgün rejenerasyonu.....	68
Şekil 4.13 PRM 6' da kültüre alındıktan 4 hafta sonra F <sub>2</sub> kademesindeki 6. Popülasyonun embriyonik kallus oluşturan anterlerinden sürgün rejenerasyonu.....	68
Şekil 4.14 PRM 1' de kültüre alındıktan 16 hafta sonra F <sub>2</sub> kademesindeki 2. popülasyonun embriyonik kallus oluşturan anterlerinden sürgün rejenerasyonu.....	69

Şekil 4.15 PRM 7' de kültüre alındıktan 14 hafta sonra F <sub>2</sub> kademesindeki 6. Popülasyonuembriyonik kallus oluşturan anterlerinden sürgün rejenerasyonu.....	69
Şekil 4.16 PRM 3' de kültüre alındıktan 18 hafta sonra F <sub>2</sub> kademesindeki 5. popülasyonun embriyonik kallus oluşturan anterlerinden sürgün rejenerasyonu.....	70
Şekil 4.17 PRM 3' te kültüre alındıktan 20 hafta sonra F <sub>2</sub> kademesindeki 6. Popülasyonun embriyonik kallus oluşturan anterlerinden sürgün rejenerasyonu.....	71
Şekil 4.18 R 6 no'lu oksin hormonu içermeyen köklendirme ortamında kültüre alındıktan 4 hafta sonra F <sub>2</sub> kademesindeki 6. Popülasyon.....	73
Şekil 4.19 R 2 no'lu köklendirme ortamında kültüre alındıktan 4 hafta sonra F <sub>2</sub> kademesindeki 5. Popülasyon.....	73
Şekil 4.20 R 0' nolu oksin hormonu içermeyen köklendirme ortamında kültüre alındıktan sonra F <sub>2</sub> kademesindeki 8. Popülasyonu.....	74
Şekil 4.21 Katlanmış haploid bitkilerin ploidi düzeylerini gösteren DNA profilleri.....	75
Şekil 4.22 Katlanmamış haploid bitkilerin ploidi düzeylerini gösteren DNA profilleri.....	75
Şekil 4.3 Diploid F <sub>2</sub> kademesindeki 8 popülasyonu DNA ploidi seviyesi.....	76

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.4 Ülkemizde nohut ekim alanı, üretim miktarı ve ortalama verimleri.....	5
Çizelge 2.5 Ülkemiz nohut üretim miktarının iller bazında dağılımı.....	6
Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan 11 farklı popülasyon ve 4 ticari çeşite ait pedigriler....	20
Çizelge 3.2 Büyüme düzenleyici hormonların çözünme ve saklama koşulları.....	28
Çizelge 3.3 Embriyonik kallus geliştirme ortamlarının (EDM) içerikleri.....	33
Çizelge 3.4 Embriyo olgunlaştırma ortamları (emm) içerikleri.....	36
Çizelge 3.5 Modifiye edilmiş MS rejenerasyon ortamı (PRM 0) içeriği.....	39
Çizelge 3.6. Farklı oksin ve sitokinin hormon konsantrasyonlarını ve kombinasyonlarını içeren sürgün rejenerasyon ortamları.....	40
Çizelge 3.7 Farklı oksin tipleri ve konsantrasyonlarını içeren köklendirme ortamları.....	41
Çizelge 4.1 Farklı ön soğuk uygulaması ve besin ortamlarının, nohut genotiplerinde embriyonik kallus oluşumuna etkilerine ilişkin varyans analizi.....	44
Çizelge 4.2 Farklı ön soğuk uygulaması ve besin ortamlarının, nohut genotiplerinde embriyonik kallus oluşumuna etkilerine ilişkin duncan testi sonuçları.....	46
Çizelge 4.3 Farklı ön soğuk uygulaması ve besin ortamlarının, nohut genotiplerinde embriyonik kallus oluşumuna etkilerine ilişkin varyans analizi.....	49
Çizelge 4.4 Farklı ön soğuk uygulaması ve besin ortamlarının, nohut genotiplerinde embriyonik kallus oluşumuna etkilerine ilişkin duncan testi sonuçları.....	51
Çizelge 4.5 Farklı ön soğuk uygulaması ve besin ortamlarının, nohut genotiplerinde olgunlaşmış embriyonik kallus oluşumu etkilerine ilişkin ait varyans analiz sonuçları.....	53
Çizelge 4.6 Farklı ön soğuk uygulaması ve besin ortamlarının, nohut genotiplerinde embriyo olgunlaştırma ortamlarında olgunlaşmış embriyonik kallus oluşumu etkilerine ilişkin duncan testi sonuçları.....	55
Çizelge 4.7 Farklı uygulamaların olgunlaşmış embriyonik kallus oluşumu etkilerine ilişkin ait varyans analiz sonuçları.....	58
Çizelge 4.8 Farklı ön soğuk uygulaması ve besin ortamlarının, nohut genotiplerinde embriyo olgunlaştırma ortamlarında olgunlaşmış embriyonik kallus oluşumu etkilerine ilişkin duncan testi sonuçları.....	60
Çizelge 4.9 Farklı uygulamaların sürgün rejenerasyon oluşumu etkilerine ilişkin varyans analiz sonuçları.....	63
Çizelge 4.10 Farklı besin ortamlarının, nohut genotiplerinde sürgün rejenerasyon oluşumu etkilerine ilişkin duncan testi sonuçları.....	66

## 1. GİRİŞ

Nohut (*Cicer arietinum* L.) *Leguminosae* takımında yer alan *Papilionacea* (kelebek çiçekliler) familyasının *Viceae* alt familyasında bulunan *Cicer* cinsidir (Şehirli 1988). *Cicer arietinum* L. cinsi, 35 çok yıllık ve 9 adet tek yıllık olmak üzere toplam 44 türden meydana gelmektedir (Toker vd. 2014, Sajja vd. 2017). Dünya iki tip nohut yetiştirilmektedir. Bunlar; tohumları küçük ve tohum rengi kahverengiden parlak sarıya değişen *desi* tipi ve tohumları büyük ve beyazdan somon rengine değişiklik gösteren *kabuli* tipi nohutlardır. Dünya nohut üretiminin %80'i *desi* tipindedir. Buna rağmen bazı ülkelerde *kabuli* nohut üretim miktarı *desi* tipi üretimin iki katına sahiptir (Singh vd. 1976).

Nohut nemi muhafaza edilmiş toprakta yetiştirilebilmektedir. Nohut yetiştirilen ülkelerin iklim yapısına göre değişmekle birlikte, bazı bölgelerde *Fusarium* ssp. solgunluğu hastalığı yaygın görülürken, kimi bölgelerde *Ascochyta* ssp. yanıklık hastalığı (antraknoz) yoğun olarak izlenmektedir. Bu nedenle bölgeye göre değişen, hastalıklara dayanıklılı materyaller geliştirilmektedir.

Nohutun orijini Batı Asya'dan Kafkasya bölgesine kadar uzanmaktadır. Nohutun ilk ortaya çıktığı kaynak Suriye'nin bitişiğinde Güneydoğu Anadolu bölgesi olarak belirlenmiş olup nohutun anavatanı olarak Türkiye gösterilmektedir (Vavilov 1951, Singh vd. 1976).

Kültürü yapılan '*Cicer arietinum* L.' kendine döllen, yatık ve dik gelişme formuna sahip tek yıllık bir baklagil türüdür. Bitkinin taç yaprağı dışında bütün organları tüyümsü yapılarla kaplıdır. Bu tüyler asit salgılayarak bitkiyi emici zararlılara karşı korumaktadır. Kültürü yapılan nohut türlerinin kromozom sayısı  $2n: 14, 16, 24, 32$  ve  $33$ 'tür (Van der Maesen vd. 2007).

Nohut tanelerinde %16.7 – 30.6 (*desi* tipi), %12.6- 29.0 (*kabuli* tipi) protein, %51-65 (*desi* tipi), %54-71 (*kabuli* tipi) oranında karbonhidrat içeren bir besin maddesidir.

Vitaminleri ve mineralleri içeriğinde yoğun olarak bulundurmaktadır (Wood ve Grusak 2007). Hayvansal proteinlere alternatif olarak kullanılmasıyla baklagiller dünyada “fakirin eti” olarak tanımlanmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde düşük proteinli gıdalara alternatif olarak beslenme programlarına alındığı bilimektedir. Bunun yanında, zengin lif ve protein içeriği sayesinde son yıllarda gelişmiş ülkelerde de beslenme programlarında yerini almıştır (Aykroyd vd. 1982).

Nohutun insan beslenmesindeki öneminin yanında, ayrıca atmosferik azotu sabitleyerek, azot (N) ihtiyacının %80'ini simbiyotik azot fiksasyonundan karşılayarak toprak verimliliğini arttırdığı bilinmektedir. Nohut, toprağa önemli miktarda azot ve organik madde kazandırarak toprak sağlığını ve verimliliğini arttırmaktadır (Saraf vd. 1998, Kantar vd. 2007). Çiftçi ve Adak (2009) yapmış oldukları araştırmada, nohut tarafından fikse edilen azot (N) miktarını, çeşide göre değişmekle birlikte, dekara ortalama 8 kg olarak bildirmişlerdir.

Bitkisel protein içerikli besinlere tercihin artmasıyla birlikte nohut tüketimine ilgi artmış bu da küresel nohut talebinin çoğalmasına neden olmuştur. Bunun yanında hem ekonomik olması hem de nohutun insan sağlığı, ürün çeşitlendirmesi ve sürdürülebilir tarım gibi diğer faydaları konusundaki farkındalıklar üreticileri nohut yetiştiriciliğine yöneltmiştir (Saraf vd. 1998).

Geleneksel ıslah yöntemleri ile yeni çeşit geliştirilmek çok ciddi zaman ve emek gerektirmektedir. Bazı bitki türlerinde doku kültürü uygulamaları ile ıslah çalışmaları birlikte yürütülmekte olup, bu uygulamalar arasında anter kültürü tekniği haploid bitki üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bilhassa anter kültürü tekniğinin bitki ıslahında kullanımı ile çok daha kısa sürede yeni çeşitler geliştirilebilmektedir (Singh vd.,1983, Çelik Özer vd., 2019). Double haploid teknolojisi bitki ıslahı ve moleküler genetik alanlarında kullanılan önemli bir araçtır. Bu teknoloji sayesinde haploid kromozom sayısına sahip bitkinin, ya kendiliğinden (doğal olarak) ya da kimyasal yardımcıları uygulanarak kromozom sayısı ikiye katlanmaktadır (Panchangam vd. 2014).

Anter kültürü tekniğinden birçok bitki türünde yararlanılmakla birlikte başarılı sonuçlar ortaya çıkmaktadır. Gelişmiş ülkelerde; anter kültürü tekniklerinden faydalanma ve devamlılığı adına baklagil türlerinde uzun yıllar önce çalışmalara başlanmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır. Ancak baklagillerin sürdürülebilir tarım sisteminde ve insan beslenmesinde büyük rolü olmasına rağmen ülkemizde herhangi bir ıslah projesi içerisinde rutin olarak anter kültürü tekniği kullanılarak haploid ve double haploid nohut bitkisi eldesine yönelik çalışmalar bilinmemektedir. Özetle nohut gibi baklagil türlerinde de haploid bitki üretim çalışmalarına gerekli desteğin sağlanması ve sürekliliğinin devam etmesi açısından bu gibi çalışmaların yapılması gerektiği düşünülmektedir.

Bu tez çalışması ile, nohutta antraknoza dayanıklı çeşit geliştirmek amacıyla farklı genotipler kullanılarak yapılan melezleme sonucunda elde edilen F<sub>2</sub> kademesindeki 11 farklı melez kombinasyonu ve 4 nohut çeşidinde yüksek frekansta double haploid bitki elde edilebilirliği amaçlanmaktadır. Bu çalışma ile dünyada uygulanmakta olan nohutta anter kültürü yöntemlerinin ülkemizde de başlatılmasına katkıda bulunulacaktır. Aynı zamanda bu çalışmanın bu alanda yapılacak sonraki araştırmalara bir model oluşturacağı öngörülmektedir.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1 Dünya’da Yemelik Tane Baklagillerin Durumu

Yemelik tane baklagiller insanlar için önemli protein kaynağıdır. Protein oranının yüksek olmasının yanında yağ oranı düşük ve besleyici bir enerji kaynağıdır. Bitkisel proteinlerin %20’si ve karbonhidratların %5’i yemelik tane baklagillerden temin edilmektedir. Daha dengeli ve kaliteli beslenme için baklagillerin tahıllarla birlikte tüketilmesi önerilmektedir.

Baklagiller havanın serbest azotunu toprağa bağlama özellikleri sayesinde toprak yapısının iyileştirilmesine katkı sağlamaktadır. Dünyada baklagillerin farklı türlerinin üretimi üzerine yoğunlaşmaktadır. Buna göre; nohut Asya, Afrika ve Amerika ülkelerinde, mercimek Amerika ve Asya ülkelerinde, kuru fasulye Asya ve Amerika ülkelerinde, bakla Asya, Afrika ve Avrupa ülkelerinde, börülce Afrika ülkesinde, bezelye ise Avrupa ve Amerika ülkelerinde yoğun olarak yayılmıştır. Dünyada 78 milyon hektar alanda 66 milyon ton yemelik tane baklagil üretimi gerçekleştirilmektedir (Anonim 2018). Dünya’da üretimi gerçekleştirilen baklagiller arasında fasulye ilk sırayı alırken bunu nohut (*Cicer arietinum* L.) izlemektedir (Anonim 2018a).

### 2.2 Dünya’da Nohut’un Genel Durumu

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) 2018 yılına ait nohut üretim verilerine göre; dünya da nohut ekim alanı ve üretim miktarları, 2007 yılında yaklaşık 11 milyon ha alanda 10 milyon ton üretim yapılmış dekara 86 kg verim alınmış, 2017 yılında yaklaşık 14,0 milyon ha alanda 14,5 milyon tona ulaşmış, dekara ortalama verim 101 kg olarak bulunmuştur. Nohut üretiminde Hindistan ilk sırayı alırken bunu ABD, Avustralya, Kanada ve Türkiye izlemektedir (Anonymous 2018, Anonim 2019). Verim bakımından sırasıyla Çin, Moldova ve Ürdün yer almaktadır. Üretim bakımından en başta yer alan Hindistan ise 95 kg/da verim ile geride kalmaktadır (Anonymous 2018, Anonim 2019b).

Dünyada 2017 yılında 3,3 milyon ton nohut ithalatı gerçekleştirilmiştir (Anonymous 2018, Anonim 2019a).

### 2.3 Türkiye’de Yemelik Tane Baklagillerin Durumu

Ülkemizde en fazla yetiştirilen yemelik tane baklagil türleri içerisinde nohut (%40) ilk sırayı alırken bunu sırasıyla mercimek (%37) ve fasulye (%21) izlemektedir. Bakla, bezelye ve börülcenin toplam baklagil ekim alanındaki payı %2,5 civarındadır. Yaklaşık 24 milyon hektar tarımsal alanın, 882 bin hektarlık alanını yemelik tane baklagiller oluşturmaktadır. Ülkemizin toplam yemelik tane baklagil üretimi ise 1,2 milyon ton’dur (Anonim 2018, Anonim 2019c).

### 2.4 Türkiye’de Nohut’un Genel Durumu

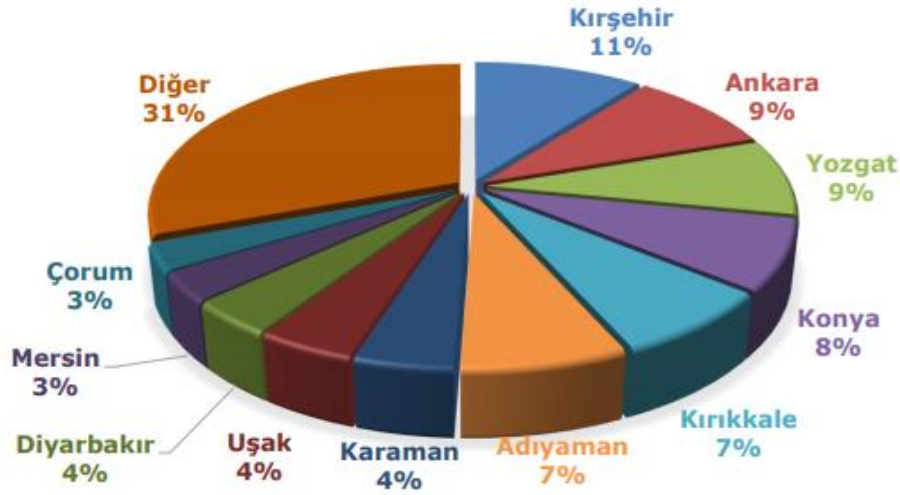
Ülkemizde en fazla yetiştiriciliği yapılan yemelik tane baklagil türü nohuttur. Ülkemizde nohut ekimi Şubat-Mayıs aylarında yapılmaktadır. Hasat zamanı ise Haziran-Ağustos aylarıdır (Anonim 2018a).

Çizelge 2.1 Ülkemizde nohut ekim alanı, üretim miktarı ve ortalama verimleri (Anonim 2018, Anonim 2019b)

Yıllar	Ekiliş (bin ha)	Üretim (bin ton)	Verim (kg/da)
2013	419.000	500.000	120
2014	388.500	455.000	114
2015	360.300	465.000	128
2016	360.500	450.000	124
2017	396.000	465.000	119
2018	450.000	540.000	120

2018 yılı üretim sezonunda ülkemizde 450 bin hektar nohut ekim alanından, 540 bin ton nohut üretilmiş, dekara ortalama verim 122 kg olarak gerçekleştirmiştir. Çizelge 2.1’de görüldüğü gibi; son yıllarda nohut üretim miktarında önemli bir artış kaydedilmiştir (Anonim 2019d).

Çizelge 2.4 Ülkemiz nohut üretim miktarının iller bazında dağılımı (Anonim 2019d)



Ülkemiz nohut üretimini yoğun olarak İç Anadolu Bölgesi’nde gerçekleştirilmektedir. Başnohut üretimi yapılan iller sırasıyla; Kırşehir, Ankara, Yozgat, Konya, Kırıkkale ve Adıyaman’dır. Ülkemizde nohut kullanım miktarı 500 bin ton civarındadır.

Büyüme ve gelişimleri esnasında bitkiler biyotik ve abiyotik (yüksek ve düşük sıcaklık, yüksek ışık, tuzluluk, kuraklık vb.) stres faktörlerine maruz kalmaktadır (Mahajan ve Tuteja 2005, Kumlay vd.2011).

Nohut veriminde etkili en önemli faktör, *Ascochyta rabiei* isimli fungusun sebep olduğu nohut yanıklığı (antraknoz) hastalığıdır. *Ascochyta* yanıklık hastalığı nohut verimini sınırlandıran biyotik stres faktörlerindedir. *Ascochyta* yanıklık, dünyada ve ülkemizde nohut ekilen alanlarında yaygın olarak görülebilen, çok ciddi verim kayıplarına neden

olan bir hastalıktır. Hastalığa yol açan *A. rabiei*'deki patojenik farklılıklar 1960'lı yıllardan itibaren bildirilmiştir (Kaiser 1973; Nene ve Reddy 1987). 1980-1990 yılları arasında patojenin 6 ırkının olduğu bildirilmiştir (Singh ve Reddy 1993). Dolar ve Gürcan (1992) tarafından, ülkemizde hastalığın 1, 4 ve 6 ırklarının varlığı belirtilmiştir. İlerleyen yıllarda yapılan araştırmalarda 3 patotip ve 9 fizyolojik ırkın sırası ile öldürücü etki yaptığını bildirilmiştir (Dolar, 2009). Hastalık, verim ve kalitede düşüğe neden olduğundan ürünün pazarlamasında üreticiye sıkıntı yaşatmaktadır. Yanıklık hastalığı, ülkemiz dahil, birçok ülkede, sıkça oluşan şiddetli epidemiler nedeniyle önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır.

Hastalık etmeni bitkinin gövde, yaprak ve baklalarında lekeler oluşturmakta bazen bitki organlarında kurumalar görülmektedir. Hastalığın gelişmesini sağlayacak koşullar oluştuğunda tamamen ürün kaybına neden olabildiği bilinmektedir. Üreticiler hastalığa yakalanmamak için ekim tarihini geciktirerek birtakım önlemler almaktadır. Bu da üründe verim kayıplarına sebep olmaktadır. Bu nedenle nohut üretimini arttırmak için hastalığa dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesine gereksinim vardır (Küsmenoğlu 1990, Açıkgöz 1994). Kış aylarında yetiştirilecek nohutların düşük sıcaklıklara dayanımının iyi olmasının beraberinde antraknoz hastalığına da dayanıklı olması gerektiğini önemle ifade edilmektedir (Çağırğan ve Toker 2001).

Hastalığın bir sonraki sezon devam etmesinde, tarlada kalan hastalıklı bitki parçaları ve enfekteli tohumlar önemli rol oynamaktadır. Hastalığın gelişip yayılmasında ise yağmur, sıcaklık ve rüzgâr gibi dış faktörlerin etkili olduğu bilinmektedir. Hastalık etmeninin gelişebilmesi için optimum sıcaklık 20-25 °C iken, 8-10 °C nin altında 32-35 °C'nin üstündeki sıcaklıklarda fungusun sporları çimlenememektedir. Hastalık toprak üstü kısımlarında zarara yol açabilmektedir (Küsmenoğlu 1990).

Hastalık etmeni havayla taşınıyorsa, küçük nekrotik benekler halinde yapraklarda nekrozlara neden olmaktadır. Lezyonlar kök boğazı kısmında yer alıyorsa bitkinin yaşama şansı azalmaktadır. Yaprak ve baklada görüldüğünde ise koyu renkli, dairesel çok sayıda piknitler içerir. Tohumlar hastalık etmeni ile bulaştığında; daha küçük, şekilleri bozuk ve buruşmuş olurlar. Hastalıklı tohumların üzerinde siyah veya kahverengi

lezyonlar oluşur. Gövdede koyu kahverengi lekeler oluşmuşsa hastalığın tohum kaynaklı olduğunu göstermektedir (Haware 1987). Etmen, bitkinin fotosentez aktivitesini azaltmasının yanı sıra tane oluşturmasını ve oluşan tanelerin çimlenme yüzdesini de azaltmaktadır. Neticede cılız taneler oluşmakta ve taneler hastalıkla bulaşık olmasından dolayı tohumluk olarak kullanılması söz konusu olmamaktadır.

## 2.5 Doku Kültürü ve Haploidizasyon Teknikleri

Melezleme ıslahında yeni bir çeşidin ortaya çıkış süresi çok uzundur. Bu sürenin yaklaşık 10 - 14 yıla kadar uzadığı ifade edilmektedir (Poehlman, 1959; Singh 1983; Şehirli, 1988). Son yıllarda geleneksel ıslah metotları ile biyoteknoloji alanındaki gelişmelerin (özellikle doku kültürü) kombine edilmesi ile bitki ıslahında ilerleme kaydedilmiştir. Özellikle anter kültürü tekniğinin bitki ıslahında kullanılmasıyla daha kısa sürede homozigot bitkiler elde edilmeye başlanmış ve yeni bir çeşidin ortaya çıkış süresi 3-4 yıl kısalmıştır (Singh, 1983).

*Datura stramonium* L. bitkisinde kendiliğinden haploid bitkilerin ortaya çıkmasıyla anter kültürü çalışmalarına başlanmıştır (Blakeslee vd. 1922). Bu çalışmadan feyzalınarak birçok bitki türünde kendiliğinden haploid bitki oluşturmak üzere çalışmalar yapılmaya başlanmıştır (Khush ve Virmani 1996).

Guha ve Mahashwari (1964), *Datura innoxia*'da olgunlaşmamış polen içeren anterlerden ilk haploid bitki üretimi gerçekleştirmişlerdir. O zamandan beri 200'den fazla türde haploid bitki üretimi gerçekleştirildiği bildirilmiştir. İçlerinde bazı türlerde mikrosporları izole ederek haploid bitkiye ulaşmak mümkün olabilmıştır (Keller vd. 1987a). Lichter (1982) yapmış oldukları çalışmada, *Brassica napus* türünde mikrospor kültürü uygulamışlar ve haploid embriyogenezinin indüksiyonunu optimize etmişlerdir. Böylece bu türde mikrospor kültürü ile haploid embriyolar rutin olarak elde edilebilir hale getirilmiştir (Keller vd. 1987 b).

Double haploid teknolojisi, heterozigot anne ve babadan tek adımda %100 homozigot saf hatların elde edilmesine olanak sağlamaktadır. Bu teknoloji sayesinde uzun zaman alan kendileme süresini tek generasyona indirip, homozigot, katlanmış haploid hatlar bir nesil içinde elde edilebilmektedir. Bu teknikle homozigottaki özellikler hızla düzeltilebilmektedir. Ayrıca elde edilen haploid bitkiler, resesif mutasyonların açığa çıkartılmasına kolaylık sağlamaktadır. Tüm bu avantajlar sayesinde ıslah çalışmalarında önemli bir yer tutmaktadırlar (Rajhathy 1976).

Haploid bitkiler, mikrospor veya olgunlaşmamış polen gelişim aşamasında erkek gametofitik hücrelerin *in vitro* kültürü yoluyla üretilebilmektedir. Haploid kalluslardan embriyolar gelişerek sürgün ve kök oluşumu sağlanmaktadır (Feriie ve Keller 1997). Swanson vd. (1988) yapmış oldukları çalışmada, herbisite toleranslı bitkileri *in vitro* mikrospor kültürü ile geliştirdiklerini ifade etmektedir.

Haploid embriyolar ve katlanmış haploid bitkiler mutasyon ıslahında, genetik mühendisliği, biyokimyasal ve fizyolojik çalışmalarda, transgenik bitkilerin elde edilmesinde kullanılmaktadır (Swanson and Erickson 1989). Buğday, arpa, çeltik ve mısır, gibi tarla bitkilerinde ve biber, kolza ve patlıcan gibi birçok türde double haploid tekniğinden faydalanılmaktadır (Ellialtıoğlu vd. 2001).

Anter kültüründe mikrosporlar bölündükten sonra oluşan bölünen hücreler sporofitik gelişimine devam etmektedir. Bu gelişim süreci haploid embriyo oluşumunda izlenen en temel yoldur (Wilson vd. 1978). Tek çekirdekli mikrosporlar doğal yolla bölündükten sonra vejetatif hücre bölünmelerinden sporofitler oluşarak farklı bir yol izleyebilmektedir. Bu gelişim sürecine arpa, buğday, mısır gibi birçok türde rastlanmıştır (Bhojwani ve Razdan 1996).

Çiçeklenme gün sayısı az ve tomurcuğu küçük türler daha yoğun androjenik kapasiteye sahip polen içermesi sebebiyle, çiçeklenmenin ilk görülmeye başlandığı zaman ve sabahın erken saatlerinde tomurcukların toplanmasının daha uygun olduğunu belirtilmektedir (Smykal, 2000). Birçok türde bu safha 'tek çekirdekli mikrospor safhası' olarak belirtilmiştir. Tek çekirdekli mikrospor safhası, mayoz bölünme sonrası

tetratların oluşmasından itibaren mitoz bölünme sonrasına kadar geçen süreci kapsar (Sunderland ve Dunwell 1977, Smykal 2015). Tomurcuğun ebatı ve şekline bakarak, fenotipik gözlem ile bu safha belirlenebilmektedir (Zamir vd. 1980).

Haploid bitkiler 'n' kromozom sayısına sahiptir. Doku kültürü tekniğinde kendiliğinden 2n kromozom sayısına sahip bitkiler oluşabildiği gibi, dışardan kimyasal uygulamalarla müdahale edilerek 2n kromozom sayısına sahip diploid bitkiler elde edilmektedir (Sarı 1994, Ellialtıoğlu vd. 2001).

Anter kültürü tekniğinin başarısında birçok faktör etkili olmaktadır. Bunlar genotip, donör bitkilerin yetiştirilme koşulları, polenin gelişim aşaması, anterlere uygulanan ön işlemler, besin ortamı bileşenleri ve kültür ortamları şeklinde çoğaltılabilir. Mityko vd. (1995) yapmış oldukları araştırmada, androjenik bitki oluşum sıklığının genotipe bağlı olarak %0.5 -75 aralığında değiştiğini belirlemişlerdir.

Sıcaklık, ışık yoğunluğu / günlük ışıklandırma süresi, bitki besleme koşulları gibi dış faktörlerin, anterlerin androgenesis başarısını etkilediği önemle ifade edilmektedir (Dodds ve Roberts 1985). Ayrıca donör bitkilerin, anterlerin alındığı döneme kadar, uygun koşullar altında yetiştirilmesi gerektiği ve doğal ışıkta yetişen bitkilerin anterlerinin daha sağlıklı polen içerdiği belirtilmiştir (Hatipoğlu 1999).

Arazi koşullarında yetiştirilen bitkiler, kontrollü koşullarda (sera ve iklim odası gibi.) yetiştirilenlere göre daha sağlıklı donör bitkilerdir. Yoğun ışık altında yetişen bitkilerden alınan anterlerin, daha zayıf ışık altında büyüyen bitkilerin anterlerine göre androgenesiste başarı şansı yüksektir. Bitkilerin fizyolojik gelişimleri, mikosporların sporofitik yeteneğine tesir etmektedir. Diğer yandan anterlerin alındığı tarihten itibaren 1 ay öncesinden, kimyasal uygulamalar tamamlanmış, stres etkileri ortadan kaldırılmış olmalıdır (Gürel vd. 1992).

*In vitro* androgenezi başlamasında birçok faktör etkilidir. Yapılan çalışmalara göre; dışardan uygulanan faktörlerin stres yaratarak anterlerde embriyogenesi başlatmada

etkili olduğu tespit edilmiştir (Arı 2006). Anterlere farklı sürelerde düşük veya yüksek sıcaklık şokları en çok tercih edilen stres uygulamalarıdır (Abdollahi 2018).

Mikrosporogenezden androgeneze geçişte, bazı bitkiler düşük sıcaklık (3-7 °C), bazı bitkiler ise yüksek sıcaklık (28-30 °C) istemektedir. Bunun yanında bazı bitkilerde androgenese geçişte düşük sıcaklık ve yüksek sıcaklıklara aynı anda ihtiyaç duymaktadır. Ayrıca düşük sıcaklıkların anterlerin canlı kalma süresini koruduğu bilinmektedir (Pelletier ve Henry 1974).

Besin ortamının ozmotik basıncı anterlerin gelişim sürecinde önemli rol oynamaktadır. Besin ortamının şeker oranı bitkiye göre değişkenlik göstermekle birlikte, şeker oranı fazla, ozmotik basıncı yüksek olduğunda anterlerin gelişimi olumsuz etkilenmektedir. Besin ortamlarında; sakkaroz, galaktoz, glukoz, maltoz, mannitol ve laktoz gibi değişik şeker türleri yaygın olarak kullanılmaktadır (Arı, 2006).

Cho ve Zapata (1990) yapmış oldukları araştırmada, anterlerin besin ortamına yerleştirme yoğunluğunun anterlerin gelişimi üzerine olumsuz etki yapabileceğini belirtmişlerdir. Şayet kültür ortamında anter yoğunluğu sık ise kültür ortamına toksik madde yayılacağından mikrosporlar gelişemeyecektir.

Anter kültürü tekniğinde besin ortamının pH seviyesi de önemli rol almaktadır. Besin ortamı pH derecelerinin 5,0- 6,5 arasında değişmesi, *in vitro* büyüme için ideal düzey kabul edilmektedir. Özellikle besin ortamının pH değerinin 5.6–5.8 aralığında olmasının bitkilerin gelişimi için daha uygun olacağı bildirilmektedir (Salunkhe vd. 1999). Ancak pH'ın 4.5'ten daha düşük veya 7'den daha yüksek olması halinde büyüme ve gelişme hızı azalacağı bilinmektedir (Hatipoğlu, 1993).

Anter kültürü tekniğinde başarı türlerine göre değişmekle birlikte aynı türe ait farklı çeşit/genotiplerde bile değişkenlik göstermektedir. Kallus oluşum miktarı, rejenerasyon oranı ve katlanmış haploid bitki sayısı gibi kriterler anter kültürü yönteminin başarısını belirlemektedir (Szakacs vd. 1988). Anter kültürü yöntemi ile ıslah sürecini kısaltan

çalışmalar şu ana kadar her bitkide standart ve rutin hale gelmemiştir. Bazı türlerde yöntem daha kolay ve hızlı bir şekilde işlerken kimi bitkilerde henüz uygulamaya tam aktarılamamıştır. Bu bitkilerde anter kültürü tekniğini standartlaştırmaya yönelik araştırmalar devam etmektedir.

## **2.6 Nohutta Haplodizasyon Çalışmaları**

Khan ve Ghosh (1983), yapmış oldukları çalışmada, nohutta ilk defa anter kültürü tekniği ile double haploid nohut bitkisi elde etmeyi amaçlamışlardır. Çalışmaları sonucunda, anterlerde indüksiyon başlamış, kallus oluşumları gözlenmiş fakat rejenerasyon başarısı elde edilememiştir.

Altaf ve Ahmad (1986); tarafından yapılan çalışmada, CM 72, 6153 ve diğer nohut genotiplerinin (ILC 195, Aug 424, C 44, CM 663, CM 88, C 727, CM 1913 ve CM 395) anter kültürü tekniğine tepkileri araştırılmıştır. Tomurcuklara birtakım ön muamelelerde bulunularak androgenesis etkisine bakılmıştır. Yaklaşık 2 mm uzunluğunda ve yeşilimsi beyaz anterlere sahip çiçek tomurcukları, tetra gelişimi aşamasında ve ilk polen mitozunda alınmıştır. İlk olarak tomurcuklar +4 °C de 3 -7 gün süreyle bekletilmiştir. Sonrasında anterler 45 dakika boyunca 1000 devir / dakika santrifüj uygulamasına tabi tutulmuştur. Santrifüj uygulaması anterleri androgenesise teşvik etmek için faydalanılan yöntemler arasında olmasına rağmen bu uygulamanın androgenesisi başlatmada etkili olmadığını çalışmadan elde edilen sonuçlar göstermektedir. Soğuk uygulaması ile anterlerde indüksiyon başlatılmış, kallus oluşumları görülmüştür. Kompakt yapıda ve yeşil renginde kalluslara BAP + NAA ve IAA kombinasyonlarını içeren ortamlarda rastlanmıştır. Kalluslar farklı hormon içeriğinde hazırlanan ortamlara ve inkübasyon koşullarına alınmış ve kallustan sürgün rejenerasyonu elde edilememiştir.

Bajaj (1983), tarafinfan anter kültürü tekniği ile farklı nohut genotiplere ait tomurcukları 3 gün 4 °C'de karanlık ve ön soğuk uygulamanın kallus oluşum etkisi araştırılmıştır. Anterler farklı hormon düzeylerinde hazırlanan MS ortamlarına alınmış, embriyonik kallus oluşumları gözlenmiştir. Kalluslar sürgün oluşumu için farklı hormon

konsantrasyonlarında hazırlanan rejenerasyon ortamlarına aktarılmıştır. Çok hücreli birkaç embriyonik kallusa rastlanılmıştır. Çalışma sonucunda kallustan somatik embriyogenez oluşmu gözlenmiş fakat sürgün rejenerasyonu sağlanamamıştır.

Prakash vd. (1992); nohutta kallus fazı yoluyla sürgün rejenerasyonu, tüm kotiledon ve sürgün ucu eksplantlarından BAP (1 mg/L) ve NAA (1 mg /L) ile takviye edilmiş B5 ortamı üzerinde kültüre alınarak elde edilmiştir.

Kumar vd. (1994); nohutta sürgün rejenerasyonu doğrudan somatik embriyogenez yoluyla geliştiği gibi, bitkinin farklı organlarından kallus yoluyla da elde edilmiştir.

Barna ve Wakhlu (1994), tarafından kallustan organogenez yoluyla C-235 nohut çeşidinde sürgün rejenerasyonları elde edilmiştir. NAA oranı yüksek ve BAP oranı düşük besin ortamlarında kallus oluşumları gözlenmiştir. BAP oranı yüksek ve IBA miktarı düşük besin ortamlarında sürgün rejenerasyonları izlenmiştir. 0,1 mg/L IBA içeren ortamlarda sürgünler köklendirilmiştir.

Polisetty vd. (1996); nohutta doğrudan sürgün organogenezi ve farklı nohut eksplantlarından kallustan bitkicikleri elde etmişlerdir. Köklendirme ortamında kullanılan tuz miktarındaki azalmalar nohutun köklenmesini kolaylaştırılabilmektedir. Araştırmada 2-3 cm sürgünler hormonsuz MS + %0.75 sukroz + %0.8 agar içeren ortamlara aktarılmış, 30 gün sonra sürgünlerde köklenmeler gözlenmiştir.

Huda vd. (2003); *C. arietinum* L. kotiledon eksplantlarından organogenez ve kallus indüksiyonu yoluyla çoklu sürgün rejenerasyonunu başarmışlardır. Yapmış oldukları çalışmada tomurcuklara soğuk şoku uygulamasının stres faktörü olarak androgenesisi başlatmada etkili olduğu belirtilmiştir. Besin ortamlarında kallus indüksiyonu için temel besin ortamı B5 + 2,4-D ve NAA hormonlarının çeşitli konsantrasyonlarını uygulamışlardır. Besin ortamının pH seviyesi 5,8 olarak belirlenmiştir. En fazla kallus oluşumu 3 mg / L 2,4 -D + 3 mg /L BAP + MS ortamında gözlenmiştir. 2 mg /L BAP + 0,5 mg/ L NAA içeren MS ortamında sürgün sayısı 2,5 adet ve sürgünlerin maksimum

tomurcuk oluşum yüzdesi %40 olarak belirlenmiştir. Rejenere olan sürgünler yaklaşık 6 - 8 hafta içersinde, 1 mg/ L IBA + ½ MS ortamında kök geliştirmiştir. Rejenere olan bitkiler toprağa başarılı bir biçimde aktarılmıştır.

Vessal vd. (2002); nohutta yapmış oldukları çalışmada; anterleri indke etmek için tomurcuklara uzun süre soğuk stresi uygulamışlardır. Tomurcukları 7-10 gün 4  C'de karanlıkta bekletmeleri sonucunda daha olgun embriyoları gözlemlemişlerdir. Besin ortamının pH seviyesi 5,8 olarak belirlenmiştir. Embriyo geliştirme ortamında MS + 0,2 mg/L kinetin + 1 mg/L 2,4-D kullanılmıştır. Modifiye edilmiş Blaydes (1966) ortamına 0,5 mg/L kinetin + %10 sukroz eklenmiş ortama kalluslar aktarılmış ve embriyonik kalluslar olgunlaştırılmıştır. Sonuç olarak embriyonik kallus oluşumları elde edilmiş ancak rejenere bitkiye ulaşılmamıştır.

Singh vd. (2002) alışmalarında; nohutta *in vitro* koşullarda elde edilen somatik embriyolardan gelişen sürgünlerin tam bitkiye dönüşüm hızının düşük olduğunu vurgulamıştır. *In vitro* koşullarında gelişen nohutlar toprağa aktarıldıklarında hayatta kalma şansının az olduğunu belirtmişlerdir. Toprağa aktarıldıklarında %60-80'inin hayatta kaldığını bildiren araştırmalar bulunmaktadır (Polysetty vd. 1997).

Sanyal vd. (2005); tarafından *in vitro* da elde edilen sürgünler, 0.5 g MS + 0.5 mg/L IBA + 0.02 g/L AgNO<sub>3</sub> + %1 sukroz + %5 agar içeren ortamlarda köklendirilmiştir.

Gürlek (2006); tarafından yapılan nohutta doku kültürü çalışmasında, değişen miktarlarda NAA (0.25, 0.50 ve 1.0 mg/L) hormonlarını bulunduran MS (1, ½ ve 1/4) ortamında sürgünler köklendirilmiştir. Daha sonra köklenme gözlenen bitkicikler kademeli olarak toprağa aktarılmıştır.

Croser vd. (2009), mikrospor kültürü tekniğini kullanarak nohutta haploid bitki elde etmişlerdir. alışmalarında, Rupali, Norayen ve Kimberley Large eşitlerinin mikrospor kültürüne daha duyarlı olduğunu tespit etmişlerdir. iek tomurcuğunun büyüklüğü ve mikrosporların gelişme durumunun birbirleriyle ilişkili olduğunu, tomurcuk

büyükliğünde çeşitten çeşide değiştiğini belirtmişlerdir. Haploid üretimde sporların ünüklear safhada olması gerektiği vurgulanmıştır. Bunun yanında araştırmacılar, kışın ve ilkbaharda yetişen donör bitkiden alınan mikrosporların haploid bitki üretimine daha duyarlı olduğunu tespit etmişlerdir. Donör bitkilerden alınan mikrospora uygulanan 24–48 saat + 4 °C soğuk uygulamasının double haploid bitki üretimine daha iyi yanıt verdiği ortaya çıkarılmıştır.

Grewal vd. (2009), nohutta ilk olarak Kanada'nın kabulü tipi CDC Xena çeşidi ve Avusturya'nın desi tipi Sonali çeşidini kullanarak anter kültürü tekniği ile double haploid embriyolar ve rejenere bitkiler elde etmişlerdir. Çalışmalarında anterlerin indüksiyonunu başlatmak için birkaç farklı stres uygulamışlardır. Bu anlamda ilk olarak araştırmada kullanılan çeşitlerden alınan tomurcuklara 4 °C'de 4 gün soğuk şoku uygulanmıştır. Diğer bir uygulama anterlerde indüksiyonu başlatmak için 50-400 V'luk elektrik şokuna maruz bırakılmış, 168–1509 g'de 2-15 dakika santrifüj edilmiş ve osmatik basıncı yüksek sıvı ortamda 4 gün süre ile bekletilmiştir. Besin ortamı olarak sırasıyla embriyo geliştirme ortamı (EDM), embriyo olgunlaştırma ortamı (EMM) ve rejenerasyon ortamı (PRM) hazırlanmıştır. Ortamların pH seviyesi 5,8 olarak belirlenmiştir. EDM ve EMM ortamlarında gelişen embriyoları 22 °C karanlıkta bekletmişler ve embriyonik kallus oluşumu gözlenenler PRM (rejenerasyon) ortamına aktararak, 24 °C'de 16/8 saat ışık/karanlıkta gelişimleri izlenmiştir. Çalışmada elde edilen bulgulara göre, 1,00 mg/L Picloram +0,40 mg/L 2-İP oksin/sitokinin hormonlarını içeren embriyonik kalluslar geliştirilmiştir. Embriyonik kalluslardan, 0,10 mg/L BAP + 0,01 mg/L NAA hormon konsantrasyonunu içeren ortamda, sürgün rejenerasyonları elde edilmiştir. Çalışmada ploidi seviyeleri; rejenere olan embriyonik kalluslarda ve bitkiciklerde ploidi cihazı ve kromozom sayımı ile belirlenmiştir. Söz konusu çalışmada elde edilen sürgünler herhangi bir köklendirme ortamına alınmamıştır. Bulunduğu ortamda uzun zaman sonra köklenerek ve toprağa aktarıldığı belirtilmektedir. Toprağa aktarılan double haploid bitkiden bakla hasadı gerçekleştirilmiştir. Anter kültürü tekniği ile double haploid nohut bitkisi elde edilen başarılı bir araştırmadır.

Anwar vd. (2010), nohutta yapmış oldukları çalışmada, gelişen sürgünleri önce B5 temel besin ortamı ortamı + 8 gr agar + NAA (0,1 mg / L) ve daha sonra NAA (1 mg / L) + aktif kömür (%0.2) ve son olarak 12 gr agar + NAA (2 mg /L) içeren ortama aktarmıştır. Agar konsantrasyonundaki artış ve ikinci ortama aktif kömür (%0,2) dahil edilmesi, kök farklılaşma yüzdesini arttırmıştır. Bir diğer uygulama olarak, sürgünler makro ve mikro besin elementleri içeren MS temel besin ortamında 1–3 hafta izlenmiştir. Çalışmadan elde edilen bulgulara göre; B5 + 0.5 mg /L NAA ortamda kültüre alınan sürgünlerde köklenmeler meydana geldiği düşünülmektedir. Organogenez ve somatik embriyogenez yoluyla nohutta sürgün rejenerasyon protokollerinden genotipe göre değişmekle birlikte faydalanılabilmektedir. Buna rağmen nohutta köklendirme aşamasında kolay sonuç alınamamıştır. Köklenme sadece sürgünler kırılğan değil sert olduğunda veya başka bir deyişle kallus oluşturma eğiliminde olmadığında gerçekleşmektedir. Oksin konsantrasyonunun artırılması ile sürgünlerde köklenme sağlanmalı, kallus oluşumuna sebep olunmamalıdır. Nohutun *in vitro* koşullarında gelişimini sınırlandıran en büyük engellerden biri güçlü kök sisteminin indüksiyonunu ve gelişmesini sağlayabilmektedir Polisetty vd. (1996).

Panchangam vd. (2014) baklagillerde anter kültürü tekniğinin çok yaygın kullanılmadığı buna rağmen son yıllarda bu teknikle nohutta double haploid bitkilerin elde edildiği çalışmalar olduğunu belirtmiştir. Bu çalışmanın odak noktası diploid nohut üretimi için verimli ve tekrarlanabilir bir protokol geliştirmektir. Bu araştırmada, anter kültürü yoluyla (ICC 4958, WR 4958, WR315, ICCV 95423) 4 genotipte double haploid bitki üretilmeye çalışılmıştır. Bu anlamda anterlerde androgenesis başlatmada etkili olan birkaç stres faktörü uygulanmıştır. İlk olarak tomurcuklara 4 °C 2-4 gün soğuk stresi uygulanmıştır. Sonra indüksiyonu başlatmak için anterlere santrifüj ve 4 gün sukroz oranı 170.000 mg/L içeren ortamda osmotik basınç uygulanmıştır. Bu çalışma sonucunda, en iyi androjenik etki, tomurcukları 2-3 mm uzunluğunda, açık sarı ve yarı saydam anterlerde gözlenmiştir. Tomurcuklara 4 °C'de 4 gün soğukluk ön uygulaması androgenesis indüksiyonunda daha etkili olmuştur. Genotipler arasında androgenesise duyarlılıkta farklılıklar gözlenmiştir. Yüksek miktarda şeker içeren (%8 - 17) ortamlarda anterlerin olumsuz etkilendiği ve santrifüj uygulamasının androgenesiste çok önemli bir etkisinin olmadığı belirtilmiştir (Grewal vd. 2009). Anter kültüründe

etkili bir netice almak için genotipe göre değişen besin ortamlarının belirlenmesi gerektiği önemle belirtilmiştir.

Abdollahi vd. (2018), tarafından kabulü tipi Bivanji ve Arman çeşitlerinde anter kültürü tekniği ile double haploid bitkiler elde etmeye çalışmışlardır. Donör bitkiler yaklaşık 450-600 µmol seviyesinde doğal ışık koşulları altında yetiştirilmiştir. Önceki araştırma sonuçlarına dayanarak (Grewal ve ark. 2009), anter kültürü için uygun tomurcuklar, 3 mm boyutunda yaklaşık 2 aylık bitkilerden alınmıştır. Tomurcuklara, 5 dakika boyunca %2,5 sodyum hipoklorit ile yüzey sterilizasyonu yapılmıştır. Daha sonra steril su içerisinde 3 x 5 dakika durulanmıştır. Tek çekirdekli mikrospor safhasında olan anterler (1mm), %1 asetokarminde ezilmiştir. Nohut anterlerinde kallus ve embriyo indüksiyonu optimizasyonu için iki farklı yöntem denemiştir. İlk yöntem stres yaratmak için anterlere soğuk (4 °C'de 4 ve 7 gün) ve sıcak şoku (30 °C'de 10 gün, 32 °C'de 2, 35 °C'de 8 saat) uygulamışlardır. İkinci yöntem yüksek miktarda 0, 2, 5 ve 10 mg/L 2,4-D ve 0, 5, 10, 15, 25 mg/L oranlarında değişen AgNO<sub>3</sub> (gümüş nitrat) aynı anda kullanılmış ve haploid embriyo oluşumuna etkisi araştırılmıştır elde etmeye çalışılmıştır. Bu çalışmada indüksiyon ortamı olarak (Grewal ve ark. 2009) 40 g/L sukroz, 40 g /L maltoz, 8 g agar ve pH 5.8 ile desteklenmiş embriyo gelişim ortamı (EDM) kullanılmıştır. Gümüş nitrat biyolojik olarak aktif kimyasallardan olup bir etilen inhibitördür. Embriyonik kallus oluşumunda olumlu etkisinin olduğunu ifade etmişlerdir. Bu çalışmada; 10 mg/L 2,4-D ve 15 mg/L gümüş nitrat içeren besin ortamında yüksek sayıda embriyonik kalluslar elde edilmiştir. Embriyogenik kalluslar daha sonra 5 mg/L gibberellikasit (GA<sub>3</sub>) + 4 mg/L indol-3-asetikasit (IAA) konsantrasyonundaki embriyo olgunlaşma ortamına (EMM) aktarılmıştır. Kùltürler, bu ortamda 20 gün boyunca karanlıkta tutulmuştur. 20 gün sonra olgun embriyolar kotiledon fazına ulaşmış ve 1 mg /L BAP + 0,01 mg /L NAA içeriğinde bitki rejenerasyon ortamına (PRM) aktarılmıştır. Embriyonik kalluslarda 60 gün içerisinde rejenerasyon gözlenmeye başlanmıştır. 4 °C'de 4 gün soğuk uygulamasında tutulan anterlerden fazla sayıda sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir. Yaklaşık 3 – 4 ay sonra köklendirme ortamına aktarılmış ordan da dış koşullara alınmıştır.

Bitkilerin ploidi seviyelerini belirlerken birçok yöntem kullanıldığını bunlardan en sık kullanılan yöntemlerin flow sitometri yöntemi ve kök ucu hücrelerden kromozom sayımı olduğu belirtilmiştir. Abdollahi vd. (2018) çalışmalarında; Eshaghi vd. (2015) tarif edilen protokole göre, kök ucu hücrelerinin kromozom sayısına bakılarak bitkilerin ploidi düzeyleri belirlenmiştir. Buna göre kromozom preparatları için nohut fidelerinin kök uçları 3 saat boyunca alfa- bromonaftalin asidi ile ön işlemden geçirilmiş ve ardından 24 saat boyunca asetik asit: alkol (1: 3 v / v) içinde fiksasyon yapılmıştır.



### **3. MATERYAL ve YÖNTEM**

Bu çalışmada tarla denemeleri, Tarla Bitkileri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nün (TARM) Araştırma ve Uygulama Çiftliği İkizce deneme alanında yürütülmüştür. Sera denemeleri ve doku kültürü çalışmaları ise TARM Biyoteknoloji Araştırma Merkezinde 2017-2019 yılları arasında yürütülmüştür.

#### **3.1 Bitki Materyali**

Antraknoza dayanıklı nohut çeşitleri geliştirmek amacı ile yürütülen ıslah programında farklı genotipler kullanılarak yapılan melezlemelerden elde edilen F<sub>2</sub> kademesindeki 11 farklı kombinasyon ve 4 ticari nohut çeşidi donör bitki olarak kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan 11 adet F<sub>2</sub> popülasyona ve 4 ticari çeşide ait pedigriler Çizelge 3.1'de verilmektedir.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan 11 adet F<sub>2</sub> popülasyon ve ticari çeşitlere ait pedigriler

<b><u>Popülasyonlar</u></b>	<b><u>Pedigriler</u></b>
F <sub>2</sub> 1.	NDK-1/43xUZUNLU99
F <sub>2</sub> 2.	NDK-1/43xDİKBAŞ
F <sub>2</sub> 3.	NDK-2/1xUZUNLU9
F <sub>2</sub> 4.	NDK-2/1xDİKBAŞ
F <sub>2</sub> 5.	ICC12004xUZUNLU99
F <sub>2</sub> 6.	ICC12004xDİKBAŞ
F <sub>2</sub> 7.	ICC12004x ER99
F <sub>2</sub> 8.	C.reticulatumx ICC12004 (Desi tipi )
F <sub>2</sub> 9.	ICC12004xGÖKÇE
F <sub>2</sub> 10.	ILC3279 x UZUNLU 99
F <sub>2</sub> 11.	ILC3279 x DİKBAŞ
<b><u>Çesitler</u></b>	
Gökçe	X85TH246/ILC3398XFLIP83-13
Uzunlu 99	AkN 475 X ILC 215
Er 99	FLIP85-58XSPANISH WHITE
Dikbaş	Flip 85 -58x Spanish whith

**Gökçe çeşidi;** Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü tarafından geliştirilerek 1997 yılında tescil edilmiştir. Erkenci, kurağa dayanıklı ve makinalı hasada uygun bir çeşittir. Bitki boyu 30-35 cm'dir. Olgunlaşma gün sayısı 105-110 gün arasında değişmektedir. Taneler açık krem rengindedir. Yüz tane ağırlığı 45-47 gram arasındadır. Antraknoz hastalığına toleranslı bir çeşittir.

(<http://araştırma.tarimorman.gov.tr/tarlabitkileri/>).



Şekil 3.1 Gökçe çeşidi tohumlarına ait görünüm

**Uzunlu 99 çeşidi;** Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü tarafından geliştirilerek 1999 yılında tescil edilmiştir. Erkenci, kurağa dayanıklı, olgunlaşma gün sayısı kısa bir çeşittir. Bitki boyu 45-50 cm, taneleri açık renkli ve antraknoz hastalığına orta derecede toleranslı bir çeşittir (<http://araştırma.tarimorman.gov.tr/tarlabitkileri/>).



Şekil 3.2 Uzunlu 99 çeşidin tohumlarına ait görünüm

**Er 99 çeşidi;** Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü tarafından geliştirilerek 1999 yılında tescil edilmiştir. Bitki dik olarak gelişir, boyu 30-35 cm'e kadar ulaşabilmektedir. Çiçeklenme ve olgunlaşma süreleri kısa olan erkenci ve kurağa dayanıklı bir çeşittir. Antraknoz hastalığına orta toleranslı bir çeşittir.

(<http://araştırma.tarimorman.gov.tr/tarlabitkileri/>).



Şekil 3.3 Er 99 çeşidi tohumlarına ait görünüm

**Dikbaş çeşidi;** Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü tarafından geliştirilerek 2006 yılında tescil edilmiştir. Boyu 30-35 cm erkenci bir çeşittir, kurağa toleranslı ve mekanik hasada uygun bir çeşittir. Nohut antraknoz hastalığına toleransı zayıftır.

(<http://araştırma.tarimorman.gov.tr/tarlabitkileri/>).



Şekil 3.4 Dikbaş çeşidi tohumlarına ait görünüm

## 3.2 Yöntem

### 3.2.1 Anter kültürü tekniği aşamaları

- Donör bitkilerin tarla koşullarında yetiştirilmesi
- Donör bitkilerin sera koşullarında yetiştirilmesi
- Tek çekirdekli mikrospor safhasının tespiti ve tomurcukların hasat edilmesi
- Anterlere ön soğuk uygulaması
- Büyüme düzenleyici hormonların stok çözeltilerinin hazırlanması ve muhafazası
- Tomurcukların yüzey sterilizasyonu
- Anterlerin besin ortamına aktarılması ve kurulan denemeler
- Embriyonik kallus geliştirme ortamı (EDM)
- Embriyonik kallusları olgunlaştırma ortamı (EMM)
- Sürgün rejenerasyon ortamı (PRM)
- Köklendirme (R) ortamı
- Ploidi düzeyinin belirlenmesi

Bu evreler alt başlıklar altında aşağıda detaylı bir şekilde açıklanmıştır.

### 3.2.2 Donör bitkilerin tarla koşullarında yetiştirilmesi

Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü İkizce Araştırma ve Uygulama Çiftliği deneme alanında 4 nohut çeşit (Dikbaş, Gökçe, Uzunlu 99 ve Er 99) ve antraknoza dayanlılık kaynakları ile yerli çeşit melezlerden oluşan 11 farklı melez kombinasyonu 2017, 2018 ve 2019 yıllarında Nisan ayında 30 x 4 cm bitki sıklığında en az 2 sıra elle ekilmiştir.



Şekil 3.5 Çiçeklenme döneminde materyallerin genel bir görünümü

### 3.2.3 Donör bitkilerin sera koşullarında yetiştirilmesi

Dört nohut çeşidi ve 11 melez kombinasyonunun ekim işlemlerine Temmuz ayında serada başlanmış olup, 20 gün aralıklarla 3 farklı zamanda devam edilmiştir. Tohumlar 5 numaralı plastik saksılara 1:1:1 (toprak: perlit: torf içeren) karışımlara ekilmiştir. Daha sonra, deneme bitkilerine yeşil aksamı döneminde 1 kez Vilmorin™ sıvı bitki gübresi (Anadolu Tohum Üretim ve Pazarlama A.Ş. İstanbul-Türkiye) üretici talimatı doğrultusunda hazırlanarak verilmiştir.



Şekil 3.6 Donör bitkilerin (15 genotip) 1:1:1 (toprak: perlit: torf) içeren saksılara ekimi



Şekil 3.7 Sera koşullarında farklı tarihlerde ekilen ve gelişen donör bitkilerin görünümü



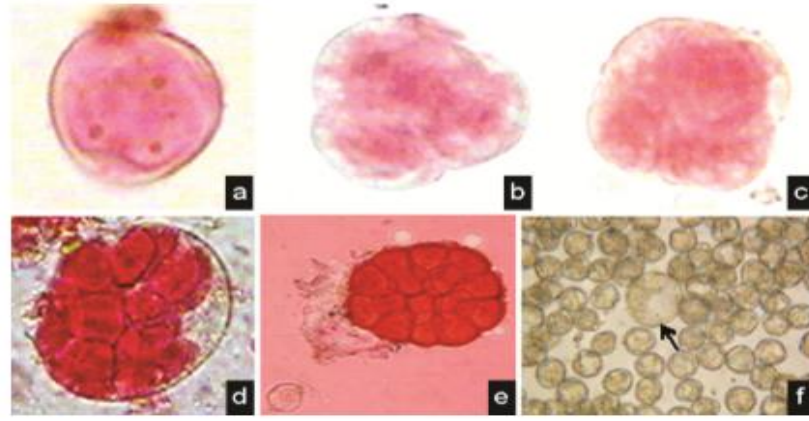
Şekil 3.8 Sera koşullarında yetiştirilen donör bitkilerin fide ve çiçeklenme dönemini

### 3.2.4 Tek çekirdekli mikrospor safhasının tespiti ve tomurcukların hasat edilmesi

2017–2019 yılları arasında yürütülen denemelerde uygun mikrospor safhasında olan çiçek tomurcukları, Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü İkizce Araştırma ve Uygulama Çiftliği deneme arazisinden sabah erken saatlerinde toplanmıştır. Tomurcuklar Haymana'daki deneme parsellerinden haziran ayında toplanmıştır. Serada ise farklı zamanlarda ekilen materyallerden yine farklı tarihlerde tomurcuk toplanmıştır. Nohut çiçek tomurcukları ıslak beyaz havlu kağıtlar arasında sandviç yapılarak, havadan bulaşıklığı azaltmak amacıyla alüminyum folyolar arasında kilitli şeffaf torbalar içerisinde saklanarak Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Biyoteknoloji laboratuvarına getirilmiştir.

Anter kültüründe mikrospor gelişim evresi başarıyı belirleyen en önemli aşamadır (Grewal vd. 2009). Tomurcuklar alınırken çiçeklerin anthesis devresine girmemiş, mayoz bölünme sonrası tetradların oluşumundan, mitoz bölünme sonrasına kadar geçen süre de 'tek çekirdekli mikrospor safhasında' olmasına dikkat edilmiştir

(Sunderland ve Dunwell 1977). Denemede kullanılmış mikrosporların uninükleat aşamada olup olmadığını kontrol etmek amacıyla tomurcuklar açılarak anterler (1mm), farmers fixative ile (% 99,9 ethanol: acetic acid 3.1) fikse edildikten sonra %1 asetokarminde ezilmiştir (Abdollahi 2018). Mikrosporlar mikroskop altında incelenmiştir. Bu çalışma ile denemede kullanılmış üninükleat mikrospor içeren anterlerin uygunlukları belirlenmiştir. Pratikte tomurcuğun ebatı ve şekline bakılarakta bu safha belirlenebilmektedir (Zamir vd. 1980).



Şekil 3.9 Nohutta mikrospor gelişme safhalarının şematik görüntüsü (Panchangam, 2014)



Şekil 3.10 (1) Antesis devresine girmemiş nohut çiçek tomurcuğu (50-55 gün) (2) Antesis devresine girmekte olan tomurcuğu (60 gün) (3) antesis devresine girmiş olan tomurcuğu (65 gün) (4 ve 5) antesis devresini geçirmekte olan tomurcuğu (70 gün) (6) antesis devresini geçirmiş tomurcuk (75-80)

### 3.2.5 Anterlere ön soğuk uygulaması

Anter kültürü çalışmalarında, stres uygulamaları gametofitik gelişmeyi engellemektedir. Bu sebeple, ve mikrosporlarda polen embriyogenesisini tetiklemek amacıyla anterlerin indüksiyonunu başlatmak amacıyla soğuk stresi uygulanmıştır.

Toplanan tomucuklar buzdolabında 0 (kontrol), 4 ve 7 gün süreyle 4 °C’de karanlıkta bekletilmiştir.

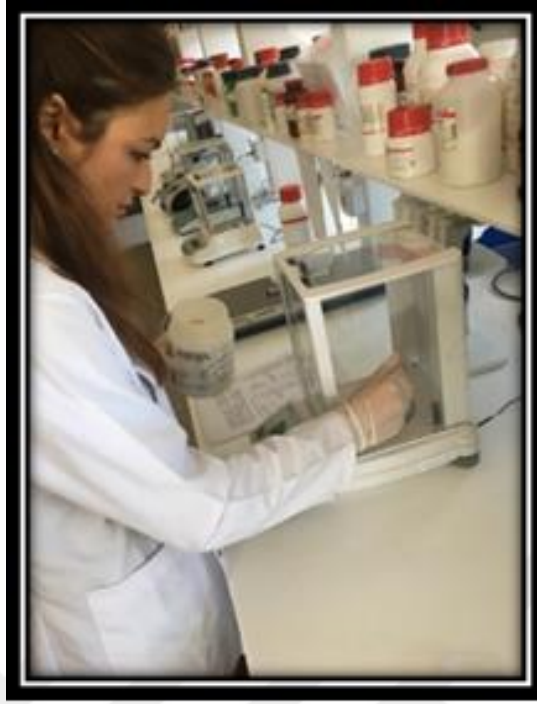


Şekil 3.11 Tek çekirdekli mikrospor safhasında olan tomurcukların araziden toplanması

### 3.2.6 Büyüme düzenleyici hormonların stok çözeltilerinin muhafazası

Çizelge 3.2. Büyüme düzenleyici hormonların çözücüleri saklama koşulları ve stok çözelti konsantrasyonları

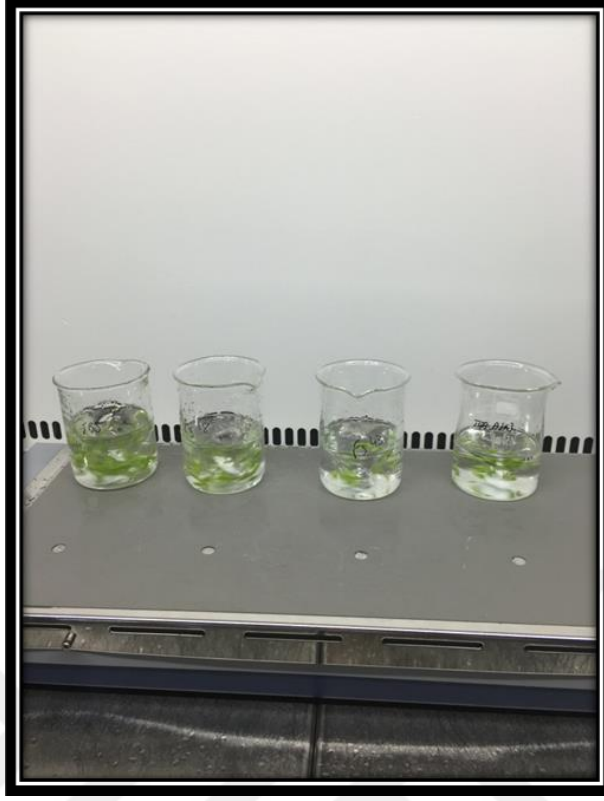
Hormonlar	Çözücü	Saklama Koşulu	Stok Çözelti Konsantrasyonu mg/mL
<b><u>Oksin</u></b>			
2,4-D	Su	2-8 °C	1
NAA	NaOH	2-8 °C	1
IBA	EtOH / NaOH	2-8 °C	1
IAA	EtOH / NaOH	0 °C	1
Pikloram	DMSO	2-8 °C	1
<b><u>Sitokinin</u></b>			
BAP	NaOH	2-8 °C	1
TDZ	DMSO	2-8 °C	1
Kinetin	NaOH	0 °C	1
Zeatin	NaOH	0 °C	1



Şekil 3.12 Hormon stok çözeltilerinin ve besin ortamlarının hazırlanması

### **3.2.7. Tomurcukların yüzey sterilizasyonu**

Tomurcukların sterilizasyonu %15 ticari çamaşır suyu (Ace, %5 NaOCl) ile 15 dk. manyetik karıştırıcıda karıştırılmış, 5×3 dk saf su ile durulama yapılmıştır. Sterilizasyon işlemi yapılan tomurcukların içersinden pens ve bistüri yardımıyla zarar vermeden çıkartılan 9 erkek organ ve 1 dişi organ farklı hormon konsantrasyonlarında hazırlanmış besin ortamlarına aktarılmıştır.



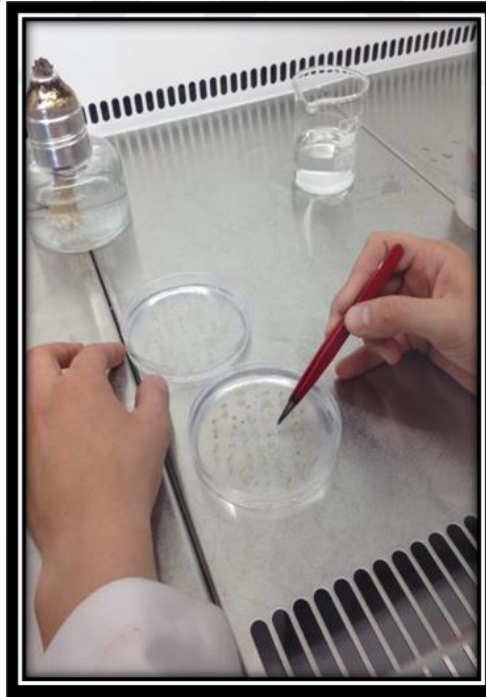
Şekil 3.13 Tek çekirdekli mikrospor döneminde ('2' ile numaralandırılan tomurcuk boyutunda) izole edilen tomurcukların %15 çamaşır suyunda ( %5 NaOCl) 15 dk süre ile steril edilerek durulanması

### 3.2.8 Anterlerin besin ortamına aktarılması ve kurulan denemeler

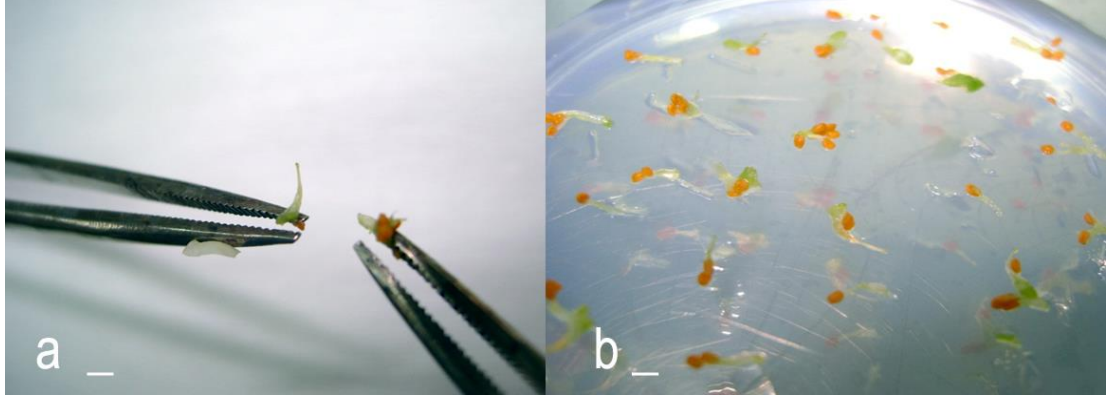
Araştırmada MS (Murashige ve Skoog 1962) ortamındaki makro ve mikro bileşikler modifiye edilerek kullanılmıştır. Ortamların pH'sı 5,8'e ayarlanmıştır. Besin ortamlarının sterilizasyonu 0.45  $\mu$ M por çapına sahip mikro filtrelerle gerçekleştirilmiştir. Besin ortamlarında katılaştırıcı 8 g/L agar (SİGMA A-4550) kullanılmıştır. Besin ortamları 6 -9 cm'lik cam ve tek kullanımlık petrilere aktarılmıştır.



Şekil 3.14 Besin ortamlarının filtre sterilizasyonu



Şekil 3.15. Yüze sterilizasyonu yapılmış tomurcuklardan pens yardımıyla anterlerin izole edilmesi (a) ve Kallus teşvik ortamlarına (EDM) yerleştirilmesi (b)



Şekil 3.16 Steril koşullarda anterlerin tomucuklardan izole edilmesi (a) Embriyonik kallus geliştirme ortamına (EDM) yerleştirilmesi (b)

### 3.2.9 Embriyonik kallus geliştirme ortamı (EDM)

Embriyonik kallus geliştirme ortamı (EDM), anterlerde embriyonik kallus oluşumuna teşvik etmek ve somatik embriyo oluşumuna yardım etmek amacıyla Grewal vd. (2009) tarafından tarif edildiği şekilde kullanılmıştır. Farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarda oksin/stokinin tipleri ve karbonhidrat kaynağı (maltoz ve sukroz) içeren, agar ile katılaştırılmış modifiye edilmiş besin ortamları hazırlanmıştır (Çizelge 3.3).

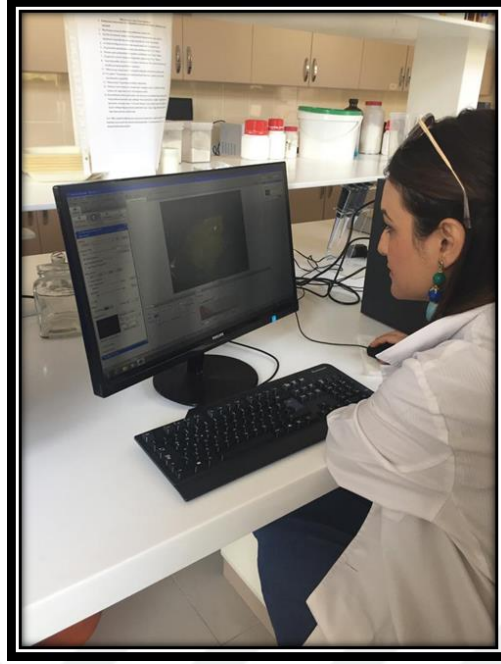
Oksin/stokinin içermeyen kontrol ortamı dahil 5 farklı EDM ortamı hazırlanmıştır. Embriyonik kallus geliştirme (EDM) ortamları Grewal vd.2009, Abdollahi vd. 2018 ve Panchangam vd. 2014 tarafından tarif edildiği şekilde modifiye edilmiştir. Her bir genotipten 9 erkek organ ve 1 dişi organ farklı hormon konsantrasyonlarında hazırlanmış EDM ortamlarına 30×10 mm'lik petri kutularına (Bio Nuclear Diagnostics Inc.Toronto, ON) aktarılmıştır. Petrilerin etrafı parafilm ile sarılmış ve 22 °C'de karanlık inkübatörde bekletilmiştir. 15 gün içerisinde anterlerde morfolojik büyüme ve farklılaşmalar başlamış, anterlerin şişerek uzadığı görülmüştür. Yaklaşık 1 ay kadar bu ortamda bekletilen anterlerde embriyo gelişimleri gözlenmiştir. 1 ay sonra oluşan kalluslar mikroskop altında incelenmiş olup embriyonik kallus oldukları belirlenenleri mikroskop görüntüleri alınarak embriyo olgunlaştırma ortamlarına aktarılmıştır.

Çizelge 3.3 Embriyonk kallus geliştirme ortamlarının (EDM) içerikleri

Bileşik	Ortam Konsantrasyonları (mg/L )				
	Kontrol	EDM 1	EDM 2	EDM 3	EDM 4
<b>Makro Elementler</b>					
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	435.00	435.00	435.00	435.00	435.00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	325.00	325.00	325.00	325.00	325.00
KNO <sub>3</sub>	2,100.000	2,100.000	2,100.000	2,100.000	2,100.000
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,000.00	1,000.00	1,000.00	1,000.00	1,000.00
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	600.00	600.00	600.00	600.00	600.00
<b>Mikro Elementler</b>					
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Kİ	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.EDTA	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00
Na <sub>2</sub> EDTA	37,3	37,3	37,3	37,3	37,3
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
<b>Vitamin</b>					
Myo-Inositol	250.00	250.00	250.00	250.00	250.00
Nikotinikasit	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Piridoksin (B6 vit.)	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Tiyamin (B1 vit.)	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Kalsiyum Pantotenat	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Glisin	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Biyotin	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Cholecalciferol (D vit.)	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Cynacobalamin (B12vit.)	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01

Çizelge 3.3 Embriyonik kallus geliştirme ortamlarının (EDM) içerikleri (devam)

<b>Karbonhidrat</b>					
Maltoz	50,000	-	50,000	50,000	50,000
Sukroz	40,000	88,000	40,000	40,000	40,000
<b>Hormon</b>					
<b>Oksinler</b>					
2,4-D	-	0,5	10	-	-
Pikloram	-	-		1,0	-
IAA	-	-	-	-	0,5
<b>Sitokininler</b>					
BAP	-	0,05	0,10	-	0,05
2-İP	-	-	-	0,40	-
<b>Organik Asitler</b>					
Absisik Asit (ABA)	-	-	-	-	
Giberellikasit (GA <sub>3</sub> )	-	-	2,00	2,00	1,00
<b>İnorganik Bileşikler</b>					
Gümüş Nitrat (AgNO <sub>3</sub> )	-	-	15	-	5
<b>Organik Bileşikler</b>					
Kasein hidrolizat (süt proteini)	300.00	300.00	300.00	300.00	300.00
Hindistan cevizi özsuyu	-	20,0	-	20,0	20,0
Glutasyon	-	-	-	1,00	1,00



Şekil 3.17 Embriyonik kallus geliştirme ortamlarında anterlerin gelişim aşamalarının takibi

### **3.2.10 Embriyo olgunlaştırma ortamı (EMM)**

EDM ortamında oluşan embriyonik kallusların olgunlaşmasına yardımcı olabilmek ve embriyoları çimlenmeye teşvik etmek amacıyla Grewal vd. (2009) tarif ettiği şekilde embriyo olgunlaştırma ortamı farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarda oksin/sitokin tipleri ile modifiye edilmiş, kontrol (oksin ve sitokin içeremeyen temel besin ortamı) ile birlikte toplam 5 farklı katı besin ortamı hazırlanmıştır.

EMM ortamına alınan embriyonik kalluslar 22 °C’de karanlık inkübatörde yaklaşık 4 hafta bekletilmiştir (Grewal vd. 2009).

Çizelge 3.4 Embriyo olgunlaştırma ortamları (EMM) içerikleri

Bileşik	Ortam Konsantrasyonu (mg/ L)				
	Kontrol	EMM (1)	EMM (2)	EMM (3)	EMM (4)
<b>Makro Elementler</b>					
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	435.00	435.00	435.00	435.00	435.00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	325.00	325.00	325.00	325.00	325.00
KNO <sub>3</sub>	2,100.000	2,100.000	2,100.000	2,100.000	2,100.000
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,000.00	1,000.00	1,000.00	1,000.00	1,000.00
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	600.00	600.00	600.00	600.00	600.00
<b>Mikro Elementler</b>					
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Mn SO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00
Zn SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
Cu SO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
KI	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00
Na <sub>2</sub> EDTA	37,3	37,3	37,3	37,3	37,3
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
<b>Vitaminler</b>					
Myo-Inositol	250.00	250.00	250.00	250.00	250.00
Nikotinkasit	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Piridoksin (B6 vit.)	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Tiyamin (B1 vit.)	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Kalsiyum Pantotenat	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Glisin	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Biyotin	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Cholecalciferol (D Vit.)	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Cynacobalamin (B12 Vit.)	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01

Çizelge 3.4 Embriyo olgunlaştırma ortamları (EMM) içerikleri (devam)

<b>Karbonhidratlar</b>					
Maltoz	50,000	50,000	50,000	50,000	50,000
Sukroz	40,000	40,000	40,000	40,000	40,000
<b>Hormonlar</b>					
<b>Oksin</b>					
2,4-D	-	-	6,00	-	-
Pikloram	-	-	-	-	4,00
IAA	-	4,00	-	-	-
Dikamba	-	-	-	4,00	-
<b>Sitokinin</b>					
BAP	-	0,50	0,50	0,50	0,50
2-İP	-	-	-	-	-
<b>Organik Asitler</b>					
Absisik Asit (ABA)	-	1,00	1,00	1,00	1,00
Giberellikasit (GA <sub>3</sub> )	-	5,00	5,00	5,00	5,00
<b>İnorganik Bileşikler</b>					
<b>Organik Bileşikler</b>					
Kasein hidrolizat (süt proteini)	300,00	300,00	300,00	300,00	300
Hindistan cevizi özsuyu	-	20,00	20,00	20,00	20,00
Glutasyon	-	1,00	1,00	1,00	1,00

### 3.2.11 Sürgün rejenerasyon ortamı (PRM)

EMM ortamında gelişen olgunlaşan embriyonik kalluslar çimlendirmek ve sürgün rejenerasyonuna teşvik etmek amacıyla Grewal vd. (2009) tarif ettiği şekilde rejenerasyon ortamları (PRM) modifiye edilerek farklı besin ortamları hazırlanmıştır. Farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarda oksin/sitokinin tipleri içeren modifiye edilmiş 1'i kontrol (oksin ve sitokinin içermeyen temel besin ortamı) olmak üzere toplam 22 farklı katı besin ortamı kullanılmıştır.

Embriyonik kallusların bulunduğu petripler 16 saat ışık fotoperiyodunda (50  $\mu$ mol s<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup>) %70 nem oranına sahip iklim dolaplarında  $24 \pm 1$  °C'de tutulmuştur. Kallusların bazıları farklı hormon miktarlarında hazırlanmış rejenerasyon ortamına aktarılırken bazıları ise hormonsuz (kontrol) ortama aktarılmıştır.

Rejenerasyon ortamına aktarılan kallusların bulunduğu petripler alüminyum folyo ile 1 hafta süresince kapatılmıştır (Şekil 3.18). Böylece yaklaşık 2 ay boyunca karanlık ortamdaki kallusların; direkt ışığa maruz bırakılmadan- kademeli bir şekilde yeni ortama adaptasyonu sağlanmıştır.



Şekil 3.18 EDM besin ortamında gelişen embriyonik kallusların PRM rejenerasyon ortamına aktarılması ve karanlık koşullarda  $24 \pm 1$  °C'de inkübe edilmesi

Çizelge 3.5 Modifiye edilmiş MS rejenerasyon ortamı (PRM 0) içeriği

<b>Bileşik</b>	<b>Ortam Konsantrasyonu (mg/L)</b>
<b>Makro Elementler</b>	<b>Kontrol</b>
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370,00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,00
KNO <sub>3</sub>	1,900.00
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,650.00
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440,00
<b>Mikro Elementler</b>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	15,6
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.03
KI	0,83
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.EDTA	27.85
Na <sub>2</sub> EDTA	37,3
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,25
<b>Vitaminler</b>	
Myo-Inositol	100,00
Nikotinkasit	1,0
Piridoksin (B <sub>6</sub> vit.)	1,0
Tiyamin (B <sub>1</sub> vit.)	10
Kalsiyum Pantotenat	1,0
Glisin	2,0
Biyotin	-
Cholecalciferol (D vit.)	0,10
Cynacobalamin (B <sub>12</sub> vit.)	0,01
<b>Karbonhidratlar</b>	
Maltoz	45,000
Sukroz	45,000
Agar	8
pH	5,8 ±0.1

Çizelge 3.6 Farklı oksin ve sitokinin hormon konsantrasyonlarını ve kombinasyonlarını içeren sürgün rejenerasyon ortamları (mg /L)

Rejenerasyon Ortamı	Temel ortam	BAP	NAA	IBA	TDZ	Kinetin	Zeatin
PRM 1	PRM 0	0,25	0,01	-	-	-	-
PRM 2	PRM 0	0,50	0,02	-	-	-	-
PRM 3	PRM 0	1,00	0,03	-	-	-	-
PRM 4	PRM 0	2,00	0,04	-	-	-	-
PRM 5	PRM 0	4,00	0,05	-	-	-	-
PRM 6	PRM 0	0,25	-	0,01	-	-	-
PRM 7	PRM 0	0,50	-	0,02	-	-	-
PRM 8	PRM 0	1,00	-	0,03	-	-	-
PRM 9	PRM 0	2,00	-	0,04	-	-	-
PRM 10	PRM 0	4,00	-	0,05	-	-	-
PRM 11	PRM 0	0,50	-	-	0,01	-	-
PRM 12	PRM 0	0,50	-	-	0,02	-	-
PRM 13	PRM 0	1,00	-	-	0,05	-	-
PRM 14	PRM 0	2,00	-	-	0,10	-	-
PRM 15	PRM 0	4,00	-	-	0,50	-	-
PRM 16	PRM 0	0,25	0,01	-	0,01	-	-
PRM 17	PRM 0	0,50	0,02	-	0,05	-	-
PRM 18	PRM 0	-	0,05	-	-	1,00	-
PRM 19	PRM 0	-	0,05	-	-	1,50	-
PRM 20	PRM 0	-	0,05	-	-	-	1,00
PRM 21	PRM 0	-	0,05	-	-	-	1,50

### 3.2.12 Köklendirme Ortamı (R)

Rejenere olan sürgünler oksin hormonu içermeyen ve farklı oksin hormon konsantrasyonlarını bulunduran, 1'i kontrol olmak üzere toplam 7 farklı köklendirme ortamına aktarılmıştır. Köklendirme ortamlarının tümünde, sürgünlerin mikro ve makro besin maddesi ihtiyaçlarını karşılayabilmek için, ½ oranında MS ortamından yararlanılmıştır (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7 Farklı oksin tipleri ve konsantrasyonlarını içeren köklendirme ortamları (R)

Köklendirme Ortamı (R)	Temel Ortam (MS)	IAA (mg/L)	NAA (mg/L)	IBA (mg/L)
R1	1/2	-	-	-
R2	1/2	0,25	-	-
R3	1/2	0,50	-	-
R4	1/2	-	0,25	-
R5	1/2	-	0,50	-
R6	1/2	-	-	0,25
R7	1/2	-	-	0,50

### 3.2.13 Ploidi düzeyinin belirlenmesi

Canlılarda kromozom sayılarında meydana gelen değişimlere “ploidi”, somatik hücrelerde ikiden fazla kromozom takımının yer almasına “poliploidi” adı verilir. Ploidi canlılardaki genlerin kopyasıdır. Kromozom kat sayılarına göre n: haploid, 2n: diploid, 3n: triploid, 4n: tetraploid ve/veya poliploid ( $\approx n$ ) şeklinde adlandırılır (Thompson vd. 1997). Mikroskop yardımıyla kromozom sayısı tespit edilerek ve/veya plody analizi cihazı kullanılarak ploidi düzeyi belirlenmektedir (Şekil 3.19).



Şekil 3.19 Ploidy analyser cihazı (sysmex cyflow ploidy analyser) ile sürgünlerde ploidi düzeylerinin belirlenmesi

Bu çalışmada örneklerin ploidi düzeyleri ploidy analyser cihazı kullanılarak tespit edilmiştir. Kontrol bitkisi olarak kromozom sayısı  $2n:16$  Azkan çeşidi kullanılmıştır. Farklı hormon konsantrasyonlarındaki rejenerasyon ortamlarında, 1-2 yapraklı sürgünlerde, kromozom katlanmasını tespit etmek amacıyla bitkiciklerde ploidi tespiti yapılmıştır. Bunun için sürgünlerden 1-2  $cm^2$ 'lik örnekler alınmış üzerine 0.4 ml cystain uv ploidi (sysmex) solüsyonu konularak keskin bir jilet yardımı ile sürgün parçaları iyice ezilmiştir. Solüsyon 30  $\mu m$  çapındaki filtreden geçirilerek, 1.6 ml dapi boyama solüsyonu eklenmiştir. Örnekler 2 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildikten sonra ploidi analyser cihazında (sysmex) ploidi seviyeleri belirlenmiştir.

### 3.3 İstatistiksel Değerlendirme

Kallus ve sürgün renerasyonu çalışmalarında her cam ve/veya tek kullanımlık petri kabında (9x6 cm) 10 anter olacak şekilde anterler yerleştirilmiştir. Tüm değişkenlerle ilgili istatistiksel analizler JMP istatistik programı ile gerçekleştirilmiştir. Üç tekerrülü tesadüf parsellerinde faktöriyel deneme desenine göre, elde edilen ortalama değerlere varyans analizi yapılmış, F testine göre önemlilik düzeyi belirlenmiştir. Ortalamalar arasındaki farklılıklar çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir.

#### **4. ARAŞTIRMA BULGULARI**

Farklı çevre koşullarında yetişen dönör bitkilerin anter kültürüne tepkilerinin araştırılması amacıyla denemeler arazi ve sera koşullarında yürütülmüştür. Tarla ve sera koşullarında yetişen dönör bitkilerden alınan anterlerlerin kallus ve sürgün oluşturma frekansları istatistiksel olarak ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

##### **4.1 Tarla Koşullarında Yetiştirilen Donör Bitkilerde Embriyonik Kallus Oluşumu Oranı**

F<sub>2</sub> kademesindeki 11 farklı melez kombinasyonu ve 4 nohut çeşidi; ön soğuk uygulamaları ve farklı hormon içeriklerine sahip kültür ortamlarında, anter kültürüne tepkileri incelenmiştir.

Tesadüf parsellerinde faktöriyel deneme deseni kullanılarak 1'i kontrol olmak üzere 5 farklı EDM ortamı hazırlanmıştır. Her bir genotipten 9 erkek organ ve 1 dişi organ farklı hormon konsantrasyonlarında hazırlanmış EDM ortamlarına 30×10 mm'lik petri kutularına (Bio Nuclear Diagnostics Inc.Toronto, ON) aktarılmıştır. 3-4 hafta sonra anterlerde embriyo gelişimleri gözlenmiş ve embriyonik kallus oldukları düşünülenlerin mikroskopta görüntüleri alınmıştır. Somatik embriyoların 'globular, kalp, torpido ve kotiledon' safhası olmak üzere toplam 4 oluşum geçirdiği bilinmektedir (De Jong ve ark., 1993). Buna göre; globular safhadaki embriyonik kalluslar 1 ay sonunda embriyo olgunlaştırma ortamlarına aktarılmıştır.

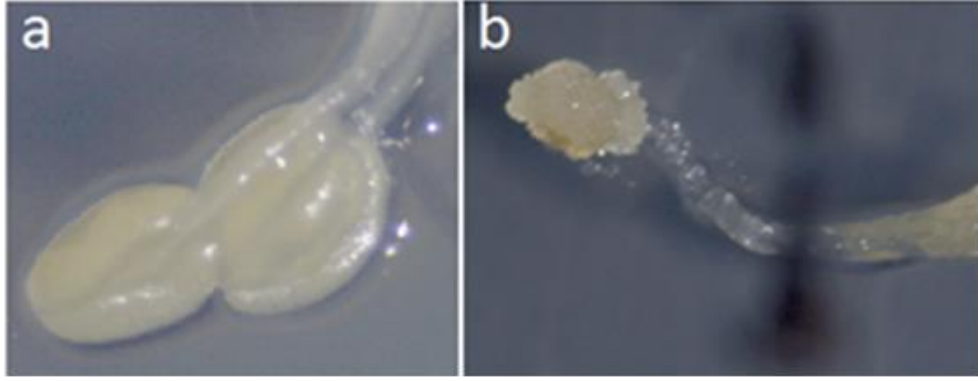
Tarla koşullarında yetişen nohut genotiplerinde, farklı ön soğuk uygulaması (Kontrol,4 ve 7 gün) ve besin ortamlarının embriyonik kallus oluşum oranına ilişkin varyans analizi yapılmış sonuçlar Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Farklı ön soğuk uygulama süresi ve besin ortamlarının, nohut genotiplerinde embriyonik kallus oluşumuna etkilerine ilişkin varyans analizi sonuçları

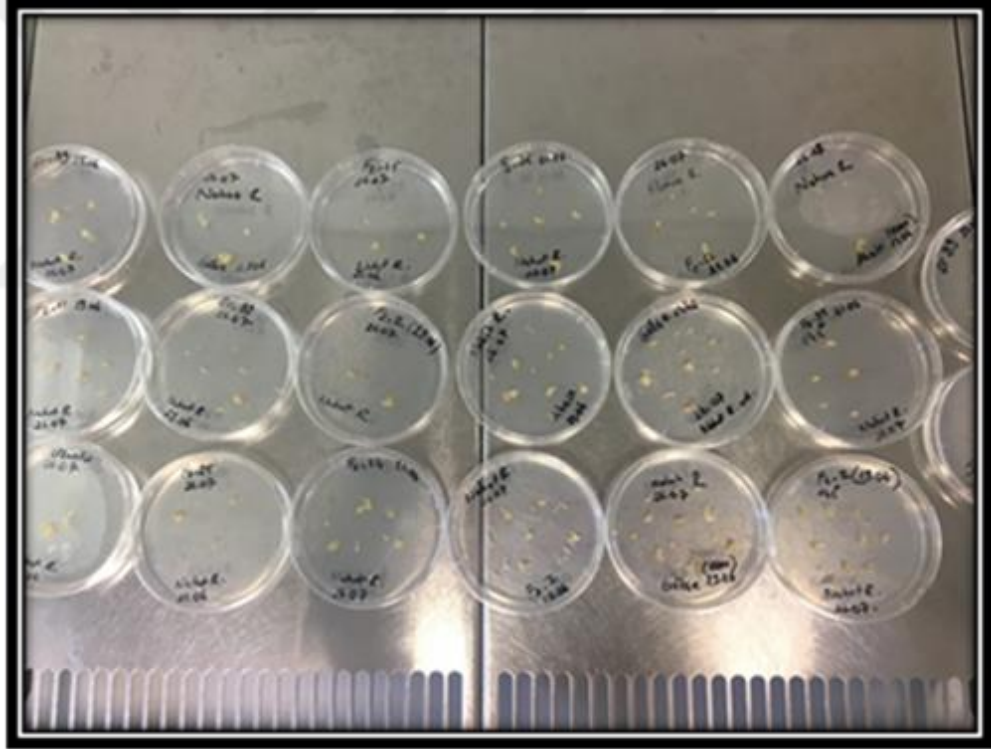
Varyasyon Kaynakları	S.D.	Kareler Toplamı	F
Genotip	14	1,569	5,351*
Ortam	4	18,225	14,015*
Soğuk	2	11,015	15,506*
Ortam x Soğuk	8	7,958	10,391*
Ortam x Genotip	56	5,880	4,355*
Soğuk x Genotip	28	6,280	7,565*
Soğuk x Genotip x Ortam	112	9,081	3,252*
HATA	640		

\*0,01 düzeyinde önemli

Çizelge 4.1 incelendiğinde, embriyonik kallus oluşum oranı bakımından nohut genotipleri, ortamlar ve soğuk uygulamaları arasındaki farklılıklar ile bu faktörlerin tüm interaksyonları istatistiksel olarak %1 düzeyinde önemli bulunmuştur. Bu farklılıkların önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan çoklu karşılaştırma testi sonuçları Çizelge 4.2’de özetlenmiştir.



Şekil 4.1 a) Kallus teşvik ortamında (EDM 2) şişerek genişlemiş anter b) EDM 2 ortamında kültüre alındıktan 2 hafta sonra kallus oluşumu



Şekil 4.2 Farklı EDM ortamları ve farklı nohut genotiplerinde kültüre alındıktan 3 hafta sonra embriyonik kallus oluşumu

Çizelge 4.2 Farklı ön soğuk uygulaması ve besin ortamlarının nohut genotiplerinde embriyonik kallus sayısı oluşum etkilerine ilişkin çoklu karşılaştırma testi sonuçları (adet)

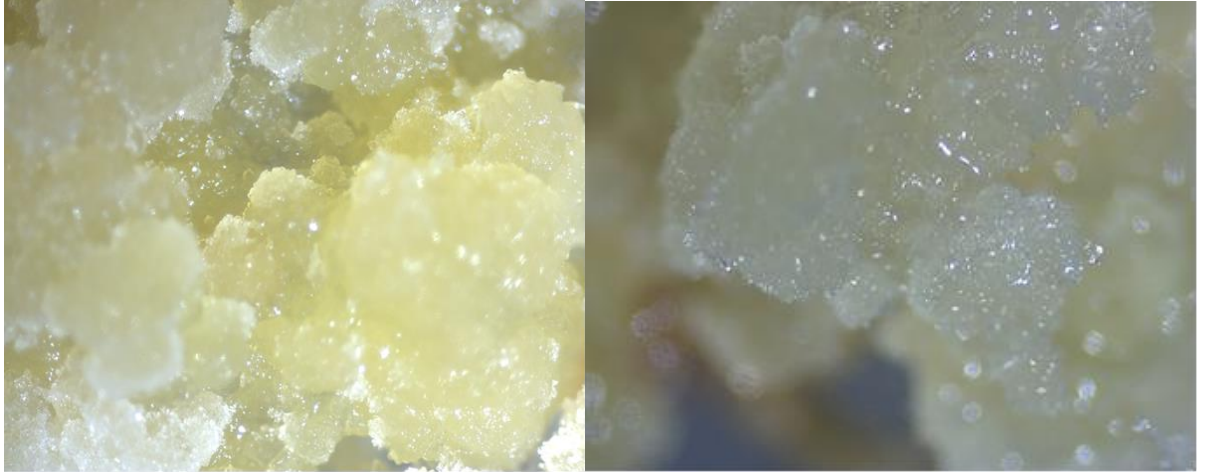
Genotip	EDM 0			EDM 1			EDM 2			EDM 3			EDM 4		
	Kontrol	4	7	Kontrol	4	7	Kontrol	4	7	Kontrol	4	7	Kontrol	4	7
F <sub>2</sub> 1	1.22 <sup>q-r</sup>	1.34 <sup>o-q</sup>	1.68 <sup>k-n</sup>	1.58 <sup>l-p</sup>	1.22 <sup>q-r</sup>	1.22 <sup>q-r</sup>	1.72 <sup>j-n</sup>	1.87 <sup>h-k</sup>	1.44 <sup>n-q</sup>	1.87 <sup>h-l</sup>	1.87 <sup>h-k</sup>	1.67 <sup>k-n</sup>	1.34 <sup>o-q</sup>	1.77 <sup>j-m</sup>	1.67 <sup>k-n</sup>
F <sub>2</sub> 2.	1.05 <sup>r-s</sup>	1.21 <sup>p-s</sup>	1.34 <sup>o-q</sup>	1.58 <sup>m-o</sup>	1.22 <sup>q-r</sup>	1.34 <sup>o-q</sup>	1.95 <sup>g-j</sup>	1.67 <sup>k-n</sup>	1.77 <sup>j-m</sup>	1.67 <sup>k-n</sup>	1.77 <sup>j-m</sup>	1.86 <sup>i-l</sup>	1.59 <sup>l-p</sup>	1.58 <sup>m-o</sup>	1.58 <sup>m-o</sup>
F <sub>2</sub> 3.	1.22 <sup>q-r</sup>	1.34 <sup>o-q</sup>	1.46 <sup>n-q</sup>	1.58 <sup>m-o</sup>	1.87 <sup>h-l</sup>	1.22 <sup>q-r</sup>	1.95 <sup>g-j</sup>	2.06 <sup>e-i</sup>	1.46 <sup>n-q</sup>	2.02 <sup>f-i</sup>	1.87 <sup>h-l</sup>	1.87 <sup>h-k</sup>	1.67 <sup>k-n</sup>	1.58 <sup>m-o</sup>	1.34 <sup>o-q</sup>
F <sub>2</sub> 4.	0.71 <sup>t</sup>	1.46 <sup>n-q</sup>	1.57 <sup>k-q</sup>	1.67 <sup>k-n</sup>	1.87 <sup>h-k</sup>	1.05 <sup>r-s</sup>	2.02 <sup>f-i</sup>	2.48 <sup>a-b</sup>	1.22 <sup>q-r</sup>	2.02 <sup>f-i</sup>	2.12 <sup>e-h</sup>	1.77 <sup>j-m</sup>	1.58 <sup>m-o</sup>	2.13 <sup>d-i</sup>	1.34 <sup>o-q</sup>
F <sub>2</sub> 5.	0.87 <sup>s-t</sup>	1.22 <sup>q-r</sup>	1.59 <sup>l-p</sup>	1.46 <sup>n-q</sup>	1.87 <sup>h-k</sup>	1.54 <sup>m-p</sup>	1.87 <sup>h-k</sup>	2.42 <sup>b-c</sup>	1.22 <sup>q-r</sup>	1.77 <sup>j-m</sup>	1.95 <sup>g-j</sup>	1.58 <sup>m-q</sup>	1.77 <sup>j-m</sup>	2.10 <sup>e-i</sup>	1.46 <sup>n-q</sup>
F <sub>2</sub> 6.	0.71 <sup>t</sup>	1.22 <sup>q-r</sup>	1.67 <sup>k-n</sup>	1.46 <sup>n-q</sup>	1.67 <sup>k-n</sup>	1.22 <sup>q-r</sup>	1.95 <sup>g-j</sup>	2.35 <sup>b-e</sup>	2.04 <sup>f-i</sup>	2.01 <sup>f-i</sup>	1.95 <sup>g-j</sup>	1.59 <sup>l-p</sup>	1.68 <sup>k-n</sup>	1.87 <sup>h-k</sup>	1.58 <sup>l-p</sup>
F <sub>2</sub> 7.	0.71 <sup>t</sup>	1.22 <sup>q-r</sup>	1.46 <sup>n-q</sup>	1.46 <sup>n-q</sup>	1.86 <sup>l</sup>	1.46 <sup>n-q</sup>	2.19 <sup>c-g</sup>	2.48 <sup>a-b</sup>	1.76 <sup>j-m</sup>	1.87 <sup>h-k</sup>	1.87 <sup>h-k</sup>	1.58 <sup>m-o</sup>	1.77 <sup>j-m</sup>	1.87 <sup>h-k</sup>	1.58 <sup>m-o</sup>
F <sub>2</sub> 8.	0.88 <sup>s-t</sup>	1.34 <sup>o-q</sup>	1.34 <sup>o-q</sup>	1.46 <sup>n-q</sup>	1.95 <sup>g-j</sup>	1.46 <sup>n-q</sup>	2.27 <sup>b-f</sup>	2.68 <sup>a</sup>	1.67 <sup>k-n</sup>	2.12 <sup>e-h</sup>	2.19 <sup>c-g</sup>	1.58 <sup>m-o</sup>	1.87 <sup>h-k</sup>	2.25 <sup>b-f</sup>	1.58 <sup>m-o</sup>
F <sub>2</sub> 9.	0.71 <sup>t</sup>	1.34 <sup>o-q</sup>	1.34 <sup>o-q</sup>	1.58 <sup>m-o</sup>	1.87 <sup>h-k</sup>	1.44 <sup>n-q</sup>	2.04 <sup>f-i</sup>	2.41 <sup>b-d</sup>	1.58 <sup>m-o</sup>	1.87 <sup>h-k</sup>	2.11 <sup>e-h</sup>	1.46 <sup>n-q</sup>	1.77 <sup>j-m</sup>	2.41 <sup>b-c</sup>	1.67 <sup>k-n</sup>
F <sub>2</sub> 10.	0.71 <sup>t</sup>	1.22 <sup>q-r</sup>	1.46 <sup>n-q</sup>	1.58 <sup>m-o</sup>	2.04 <sup>f-i</sup>	1.77 <sup>j-m</sup>	2.04 <sup>f-i</sup>	2.19 <sup>c-g</sup>	2.12 <sup>e-h</sup>	1.87 <sup>h-k</sup>	1.77 <sup>j-m</sup>	1.58 <sup>m-o</sup>	1.87 <sup>h-k</sup>	2.11 <sup>e-h</sup>	1.77 <sup>j-m</sup>
F <sub>2</sub> 11.	0.71 <sup>t</sup>	1.22 <sup>q-r</sup>	1.34 <sup>o-q</sup>	1.34 <sup>o-q</sup>	2.03 <sup>f-i</sup>	1.67 <sup>k-n</sup>	1.87 <sup>h-k</sup>	2.27 <sup>b-f</sup>	1.87 <sup>h-k</sup>	2.04 <sup>f-i</sup>	1.68 <sup>k-n</sup>	1.58 <sup>m-o</sup>	1.77 <sup>j-m</sup>	1.76 <sup>j-m</sup>	1.58 <sup>m-o</sup>
Gökçe	1.34 <sup>o-q</sup>	1.22 <sup>q-r</sup>	1.21 <sup>p-s</sup>	1.22 <sup>q-r</sup>	1.87 <sup>h-k</sup>	1.58 <sup>m-o</sup>	2.11 <sup>e-h</sup>	2.19 <sup>c-g</sup>	1.95 <sup>g-j</sup>	2.12 <sup>e-h</sup>	1.87 <sup>h-k</sup>	1.58 <sup>m-o</sup>	1.95 <sup>g-j</sup>	2.04 <sup>f-i</sup>	1.77 <sup>j-m</sup>
Uzunlu 99	0.71 <sup>t</sup>	1.22 <sup>q-r</sup>	1.22 <sup>q-r</sup>	1.22 <sup>q-r</sup>	1.87 <sup>h-k</sup>	1.58 <sup>m-o</sup>	1.87 <sup>h-k</sup>	2.41 <sup>b-d</sup>	1.58 <sup>m-o</sup>	1.87 <sup>h-k</sup>	1.87 <sup>h-k</sup>	1.77 <sup>j-m</sup>	1.86 <sup>i-l</sup>	2.13 <sup>d-i</sup>	1.67 <sup>k-m</sup>
Er 99	1.06 <sup>r-s</sup>	1.34 <sup>o-q</sup>	1.22 <sup>q-r</sup>	1.22 <sup>q-r</sup>	1.87 <sup>h-k</sup>	1.46 <sup>n-q</sup>	1.67 <sup>k-n</sup>	1.95 <sup>g-j</sup>	1.87 <sup>h-k</sup>	1.34 <sup>o-q</sup>	1.87 <sup>h-k</sup>	2.04 <sup>f-i</sup>	1.58 <sup>m-o</sup>	1.76 <sup>j-m</sup>	1.68 <sup>k-n</sup>
Dikbaş	0.71 <sup>t</sup>	1.77 <sup>j-m</sup>	1.22 <sup>q-r</sup>	1.58 <sup>m-o</sup>	1.22 <sup>q-r</sup>	1.22 <sup>q-r</sup>	1.68 <sup>k-n</sup>	2.04 <sup>f-i</sup>	1.77 <sup>j-m</sup>	1.34 <sup>o-q</sup>	1.87 <sup>h-k</sup>	1.76 <sup>j-m</sup>	1.58 <sup>m-o</sup>	1.77 <sup>j-m</sup>	1.87 <sup>h-k</sup>
C.V(%)	14.63														

Çizelge 4.2'de görüldüğü üzere; tüm ortam ve genotiplerde kallus oluşumu gözlenmiştir. Ön soğuk uygulamaları arasında en fazla kallus oluşumu 4 °C'de 4 gün soğuk uygulamasında, en fazla kallus 2.68 adet ile hormon kombinasyonu 10 mg /L 2,4-D + 0,10 mg/L TDZ+ 15 mg/L AgNO<sub>3</sub> olan EDM 2 no'lu ortamda F<sub>2</sub> 8.popülasyonunda, en az kallus sayısı ön soğuklama yapılmayan, 0.71 adet ile hormon içermeyen EDM 0 no'lu kontrol ortamında elde edilmiştir.

Ön soğuklama yapılmayan anterlerde; en fazla kallus 2.27 adet ile 10 mg/L 2,4-D + 0,10 mg/L TDZ + 15 mg/L AgNO<sub>3</sub> olan EDM 2 no'lu ortamda F<sub>2</sub> 8.popülasyonunda elde edilmiştir. Bunu 2.19 adet ile yine aynı ortamda F<sub>2</sub> 7. popülasyonu takip etmiştir. Bununla birlikte; en az kallus 0.71 adet ile hormon içermeyen EDM 0 no'lu kontrol ortamında F<sub>2</sub> 4, 6, 7, 9 popülasyonları ile Uzunlu 99 ve Dikbaş çeşitlerinde izlenmiştir.

Dört gün ön soğuklama yapılan anterlerde; en fazla kallus 2.68 adet ile 10 mg/L 2,4-D + 0,10 mg/L TDZ + 15 mg/L AgNO<sub>3</sub> içeren EDM 2 no'lu ortamda F<sub>2</sub> 8.popülasyonda elde edilirken bunu 2.48 adet ile yine EDM 2 no'lu ortamda F<sub>2</sub> 4 ve F<sub>2</sub> 6 popülasyonları takip etmiştir. En az kallus sayısı 1.21 adet ile hormon içermeyen EDM 0 no'lu kontrol ortamında F<sub>2</sub> 2. popülasyonunda gözlenmiştir.

Yedi gün ön soğuklamada ise; en fazla kallus 2.12 adet ile 10 mg/L 2,4-D + 0,10 mg/L TDZ + 15 mg/L AgNO<sub>3</sub> içeren EDM 2 no'lu ortamda F<sub>2</sub> 10. popülasyonda izlenmiştir. Bunu 2.04 adet ile hormon kombinasyonu 10 mg/L 2,4-D + 0,10 mg/L TDZ + 15 mg/L AgNO<sub>3</sub> içeren EDM 2 no'lu ortamda F<sub>2</sub> 6. popülasyonu ve hormon kombinasyonu 1 mg/L Picloram+ 0,40 mg/L 2-İP içeren EDM 3 no'lu ortamda Er 99 çeşidi takip etmiştir. Aynı uygulamada, en az kallus 1.05 adet ile hormon kombinasyonu 0,53 mg/L 2,4-D + 0,26 mg/L Pikloram+ 0,09 mg/L TDZ içeren EDM 1 ortamında F<sub>2</sub> 4 popülasyonunda gözlenmiştir.



Şekil 4.3 F<sub>2</sub> 8 popülasyonunda, EDM 2 ortamında, kültüre alındıktan 4 hafta sonra embriyonik kallus oluşumu

#### **4.2 Sera Koşullarında Yetiştirilen Donör Bitkilerde Embriyonik Kallus Oluşumu**

Embriyo geliştirme ortamı anterlerin indüksiyonunu başlatmak ve embriyo oluşumuna teşvik etmek amacıyla oluşturulmuştur.

Tesadüf parsellerinde faktöriyel deneme deseni kullanılarak 1'i kontrol olmak üzere 5 farklı EDM ortamı hazırlanmıştır. Her bir genotipten 9 erkek organ ve 1 dişi organ farklı hormon konsantrasyonlarında hazırlanmış EDM ortamlarına 30×10 mm'lik petri kutularına (Bio Nuclear Diagnostics Inc.Toronto, ON) aktarılmıştır. 4 hafta sonra anterlerde embriyo gelişimleri gözlenmiş ve embriyonik kallus oldukları düşünülenlerin mikroskopta görüntüleri alınmıştır. Buna göre; embriyonik kalluslar 1 ay sonunda embriyo olgunlaştırma ortamlarına aktarılmıştır.

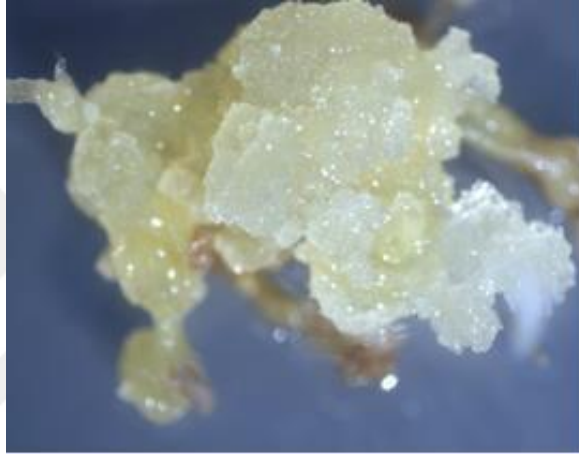
Sera koşullarında yetişen nohut genotiplerinde, farklı ön soğuk uygulaması ve besin ortamlarının embriyonik kallus oluşum oranına ilişkin varyans analizi yapılmış, sonuçlar Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3 Farklı ön soğuk uygulama süresi ve besin ortamlarında, nohut genotiplerinde embriyonik kallus oluşumuna etkilerine ilişkin varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	S.D.	Kareler Toplamı	F
Genotip	14	6,601	11,228*
Ortam	4	4,151	24,713*
Soğuk	2	1,332	15,868*
Ortam x Soğuk	8	2,147	6,391*
Ortam x Genotip	56	3,590	1,527*
Soğuk x Genotip	28	1,131	0,962*
Soğuk x Genotip x Ortam	112	2,593	0,551*
HATA	824	44,890	

\* 0.01 düzeyinde önemli.

Varyans analiz sonuçlarına göre, kültür ortamları, ön soğuk uygulamaları ve genotipler arasında 0,01 düzeyinde önemli farklılıklar belirlenmiştir. Ortam x soğuk, ortam x genotip, soğuk x genotip interaksiyonları 0,01 düzeyinde farklılıklar bulunmuştur. Denemede ele alınan faktörlerin üçlü interaksiyonu da (soğuk x genotip x ortam) 0,01 düzeyinde önemli çıkmıştır (Çizelge 4.3). Bu farklılıkların önem seviyesini belirlemek amacıyla yapılan çoklu karşılaştırma testi sonuçları Çizelge 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.4 Sera koşullarında yetişen F<sub>2</sub> 6 popülasyonunun, EDM 2 ortamında kültüre alındıktan 3 hafta sonra embriyonik kallus oluşumu

Çizelge 4.4 Farklı ön soğuk uygulaması ve besin ortamlarının, nohut genotiplerinde embriyonik kallus oluşumuna etkilerine ilişkin çoklu karşılaştırma testi sonuçları (adet)

Genotip	EDM 0			EDM 1			EDM 2			EDM 3			EDM 4		
	Kontrol	4	7	Kontrol	4	7	Kontrol	4	7	Kontrol	4	7	Kontrol	4	7
F <sub>2</sub> 1.	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.94 <sup>d-1</sup>	0.79 <sup>g-1</sup>	0.79 <sup>g-1</sup>	0.81 <sup>f-1</sup>	1.14 <sup>bd</sup>	0.96 <sup>c-h</sup>	0.81 <sup>f-1</sup>	0.96 <sup>c-h</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.79 <sup>g-1</sup>	0.96 <sup>c-h</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>
F <sub>2</sub> 2.	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.96 <sup>c-h</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.79 <sup>g-1</sup>	0.94 <sup>d-1</sup>	0.96 <sup>c-h</sup>	0.96 <sup>c-h</sup>	0.96 <sup>c-h</sup>	1.05 <sup>bc</sup>	0.96 <sup>c-h</sup>	0.81 <sup>f-1</sup>	0.96 <sup>c-h</sup>	0.87 <sup>e-1</sup>
F <sub>2</sub> 3.	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.79 <sup>g-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.79 <sup>g-1</sup>	0.87 <sup>e-1</sup>	1.05 <sup>b-f</sup>	0.79 <sup>g-1</sup>	0.94 <sup>d-1</sup>	0.94 <sup>d-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.88 <sup>cd</sup>	0.88 <sup>cd</sup>
F <sub>2</sub> 4.	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>d</sup>	0.87 <sup>e-1</sup>	0.79 <sup>g-1</sup>	0.79 <sup>g-1</sup>	1.14 <sup>b-d</sup>	0.87 <sup>e-1</sup>	0.87 <sup>e-1</sup>	0.96 <sup>c-h</sup>	0.96 <sup>c-h</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>d</sup>	0.96 <sup>c-h</sup>
F <sub>2</sub> 5.	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.99 <sup>c-g</sup>	0.96 <sup>c-h</sup>	0.81 <sup>f-1</sup>	0.99 <sup>c-g</sup>	1.24 <sup>ab</sup>	0.94 <sup>d-1</sup>	1.05 <sup>bc</sup>	0.96 <sup>c-h</sup>	0.96 <sup>c-h</sup>	0.96 <sup>c-h</sup>	1.19 <sup>bc</sup>	0.87 <sup>e-1</sup>
F <sub>2</sub> 6.	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	1.02 <sup>b-g</sup>	0.96 <sup>c-h</sup>	1.02 <sup>b-g</sup>	1.14 <sup>b-d</sup>	1.44 <sup>a</sup>	0.96 <sup>c-h</sup>	1.02 <sup>b-g</sup>	0.96 <sup>c-h</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	1.02 <sup>b-g</sup>	0.97 <sup>b-d</sup>
F <sub>2</sub> 7.	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.79 <sup>g-1</sup>	0.79 <sup>g-1</sup>	0.79 <sup>g-1</sup>	0.94 <sup>d-1</sup>	1.19 <sup>bc</sup>	0.79 <sup>g-1</sup>	0.87 <sup>e-1</sup>	0.96 <sup>c-h</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.87 <sup>e-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>
F <sub>2</sub> 8.	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.81 <sup>f-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.81 <sup>f-1</sup>	1.14 <sup>b-d</sup>	0.79 <sup>g-1</sup>	0.81 <sup>f-1</sup>	0.79 <sup>g-1</sup>	0.79 <sup>g-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.79 <sup>g-1</sup>	0.79 <sup>g-1</sup>
F <sub>2</sub> 9.	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	1.02 <sup>b-g</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.79 <sup>g-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.87 <sup>e-1</sup>	0.79 <sup>g-1</sup>
F <sub>2</sub> 10.	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.87 <sup>e-1</sup>	1.09 <sup>be</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.96 <sup>c-h</sup>	0.88 <sup>cd</sup>
F <sub>2</sub> 11.	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	1.02 <sup>b-g</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.81 <sup>f-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>
Gökçe	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.79 <sup>g-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.87 <sup>e-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.79 <sup>g-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>
Uzunlu 99	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>d</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>
Er 99	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>d</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>
Dikbaş	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>	0.71 <sup>d</sup>	0.71 <sup>h-1</sup>
C.V(%)	20.22														

Çizelge 4.4'te belirtildiği gibi tüm genotiplerde ve hazırlanan 5 embriyonik kallus teşvik ortamında kallus oluşumu gözlenmiştir. Ön soğuk uygulamaları arasında kıyaslama yapıldığında en fazla kallus oluşumu 4 °C'de 4 gün soğuk uygulamasında ve en fazla kallus sayısı 1.44 adet ile 10 mg/L 2,4-D + 0,10 mg/L TDZ + 15 mg/L AgNO<sub>3</sub> içeren EDM 2 ortamda F<sub>2</sub> 6. popülasyonunda elde edilmiştir. En az kallus sayısı ise 0.71 adet ile hormon içermeyen EDM 0 kontrol ortamında bulunmuştur.

Ön soğuklama yapılmayan anterlerde en fazla kallus sayısı 1.14 adet ile 10 mg/L 2,4-D + 0,10 mg/L TDZ + 15 mg/L AgNO<sub>3</sub> içeren EDM 2 ortamında F<sub>2</sub> 6 popülasyonunda elde edilmiştir. Bunu 1.24 adet ile aynı ortamda F<sub>2</sub> 5 popülasyonu izlemiştir. Hormon kombinasyonu 1 mg/L Pikloram+ 0,40 mg/L 2-İP içeren EDM 3 no'lu ortamda yine aynı popülasyon takip etmiştir. 4 °C'de 0 gün soğuk uygulamasında en az sayıda kallus sayısı 0.71 adet ile hormon içermeyen (EDM 0) kontrol ortamında tüm F<sub>2</sub> popülasyonları ve Gökçe, Uzunlu 99 ve Dikbaş çeşitlerinde izlenmiştir.

Dört gün ön soğuklama uygulamasında en fazla kallus sayısı 1.44 adet ile 10 mg/L 2,4-D + 0,10 mg/L TDZ + 15 mg/L AgNO<sub>3</sub> içeren EDM 2 ortamda F<sub>2</sub> 6. popülasyonunda elde edilmiştir. Bunu 1.22 adet ile yine aynı ortamda F<sub>2</sub> 5 popülasyonu izlemiştir. En az kallus sayısı 0.71 adet ile hormon içermeyen (EDM 0) kontrol ortamında tüm F<sub>2</sub> popülasyonları, Gökçe, Uzunlu 99 ve Dikbaş çeşitlerinde belirlenmiştir.

Yedi gün soğuk uygulamasında en fazla kallus sayısı 1.02 adet ile 0,53 mg/L 2,4-D + 0,26 mg/L picloram+ 0,09 mg/L TDZ içeren EDM 1 ortamda F<sub>2</sub> 6 popülasyonunda elde edilmiştir. En az kallus sayısı 0.71 adet ile hormon içermeyen (EDM 0) kontrol ortamında bulunmuştur.

### 4.3 Tarla Koşullarında Yetiştirilen Donör Bitkilerde Olgunlaşmış Embriyonik Kallus Oluşumu

Embriyo olgunlaştırma ortamı (EMM) embriyoları olgunlaştırarak çimlenmeye teşvik etmek amacıyla oluşturulmuştur. Birtanesi kontrol olmak üzere 5 farklı EMM ortamı hazırlanmıştır. EDM ortamında oluşan embriyonik kalluslar 1 ay sonunda olgunlaştırılmak üzere farklı embriyo olgunlaştırma ortamlarına (EMM) aktarılmıştır. Oksinlerin embriyo oluşumunu ve olgunlaşmasını teşvik ettiği bilinmektedir (Panchangam vd. 2014). Hazırlanan EMM ortamlarında embriyoların olgunlaşmasına teşvik etmek amacıyla oksin hormon miktarları yüksek tutulmuştur.

Tarla koşullarında yetişen nohut genotiplerinde, farklı ön soğuk uygulaması ve besin ortamlarının olgunlaşmış embriyonik kallus oluşumu etkilerine ilişkin varyans analizi yapılmış, sonuçlar Çizelge 4.5'te verilmiştir.

Çizelge 4.5 Farklı ön soğuk uygulama süresi ve besin ortamlarının, nohut genotiplerinde olgunlaşmış embriyonik kallus oluşumu etkilerine ilişkin varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	S.D.	Kareler Toplamı	F
Genotip	14	9,898	25,098*
Ortam	4	21,842	193,862*
Soğuk	2	10,941	194,227*
Ortam x Soğuk	8	4,807	21,333*
Ortam x Genotip	56	6,413	4,586*
Soğuk x Genotip	28	3,769	4,779*
Soğuk x Genotip x Ortam	112	7,516	2,382*
HATA	416	12,168	<,0001*

\* 0.01 düzeyinde önemli.

Elde edilen sonuçlara göre; kültür ortamları, 4 °C ön soğuk uygulamaları (Kontrol, 4 ve 7 gün) ve tüm genotipler arasında 0,01 düzeyinde önemli farklılıklar gözlenmiştir. Ortam x soğuk, ortam x genotip, soğuk x genotip interaksyonları 0,01 düzeyinde farklılıklar bulunmuştur. Denemede ele alınan faktörlerin üçlü interaksyonları değerlendirildiğinde ise soğuk x genotip x ortam uygulamaları arasındaki interaksyon 0,01 düzeyinde önemli çıkmıştır (Çizelge 4.5). Bu farklılıkları belirten çoklu karşılaştırma testi sonuçları Çizelge 4.6’te verilmiştir.



Çizelge 4.6 Farklı ön soğuk uygulaması ve besin ortamlarının, nohut genotiplerinde embriyo olgunlaştırma ortamlarında olgunlaşmış embriyonik kallus oluşumu etkilerine ilişkin çoklu karşılaştırma testi sonuçları (adet)

Genotip	EMM 0			EMM 1			EMM 2			EMM 3			EMM 4		
	Kontrol	4	7	Kontrol	4	7	Kontrol	4	7	Kontrol	4	7	Kontrol	4	7
F <sub>2</sub> 1.	1.58 <sup>j-o</sup>	1.22 <sup>p-q</sup>	1.55 <sup>l-n</sup>	1.77 <sup>h-l</sup>	1.77 <sup>h-l</sup>	1.34 <sup>n-p</sup>	1.87 <sup>f-k</sup>	2.54 <sup>a</sup>	1.58 <sup>j-o</sup>	1.72 <sup>l-m</sup>	1.95 <sup>e-i</sup>	1.46 <sup>m-p</sup>	1.67 <sup>j-m</sup>	2.18 <sup>cde</sup>	1.34 <sup>n-p</sup>
F <sub>2</sub> 2.	1.34 <sup>n-p</sup>	1.58 <sup>j-o</sup>	1.55 <sup>l-n</sup>	1.46 <sup>m-p</sup>	1.58 <sup>j-o</sup>	1.58 <sup>j-o</sup>	1.46 <sup>m-p</sup>	2.12 <sup>d-g</sup>	1.22 <sup>p-q</sup>	1.05 <sup>q-r</sup>	1.87 <sup>f-k</sup>	1.58 <sup>j-o</sup>	1.67 <sup>j-m</sup>	1.87 <sup>f-k</sup>	1.05 <sup>q-r</sup>
F <sub>2</sub> 3.	1.58 <sup>j-o</sup>	1.28 <sup>o-q</sup>	1.22 <sup>p-q</sup>	1.58 <sup>j-o</sup>	1.55 <sup>l-n</sup>	1.34 <sup>n-p</sup>	1.77 <sup>h-l</sup>	1.72 <sup>l-m</sup>	1.22 <sup>p-q</sup>	1.77 <sup>h-l</sup>	1.87 <sup>f-k</sup>	1.34 <sup>n-p</sup>	1.67 <sup>j-m</sup>	1.28 <sup>o-q</sup>	1.05 <sup>q-r</sup>
F <sub>2</sub> 4.	1.22 <sup>p-q</sup>	1.55 <sup>l-n</sup>	1.58 <sup>j-o</sup>	1.67 <sup>j-m</sup>	1.55 <sup>l-n</sup>	1.58 <sup>j-o</sup>	1.46 <sup>m-p</sup>	1.77 <sup>h-l</sup>	1.55 <sup>l-n</sup>	1.67 <sup>j-m</sup>	1.67 <sup>j-m</sup>	1.58 <sup>j-o</sup>	1.55 <sup>l-n</sup>	1.87 <sup>f-k</sup>	1.55 <sup>l-n</sup>
F <sub>2</sub> 5.	1.05 <sup>q-r</sup>	1.67 <sup>j-m</sup>	1.55 <sup>l-n</sup>	1.22 <sup>p-q</sup>	1.85 <sup>g-j</sup>	1.22 <sup>p-q</sup>	1.77 <sup>h-l</sup>	2.15 <sup>c-f</sup>	1.87 <sup>f-k</sup>	1.77 <sup>h-l</sup>	1.85 <sup>g-j</sup>	1.46 <sup>m-p</sup>	1.55 <sup>l-n</sup>	2.25 <sup>bcd</sup>	1.05 <sup>q-r</sup>
F <sub>2</sub> 6.	1.55 <sup>l-n</sup>	1.58 <sup>j-o</sup>	1.28 <sup>o-q</sup>	1.46 <sup>m-p</sup>	1.87 <sup>f-k</sup>	1.55 <sup>l-n</sup>	1.46 <sup>m-p</sup>	2.47 <sup>ab</sup>	1.77 <sup>h-l</sup>	1.95 <sup>e-i</sup>	2.18 <sup>cde</sup>	1.55 <sup>l-n</sup>	1.77 <sup>h-l</sup>	2.41 <sup>abc</sup>	0.70 <sup>s</sup>
F <sub>2</sub> 7.	1.46 <sup>m-p</sup>	1.55 <sup>l-n</sup>	1.58 <sup>j-o</sup>	1.58 <sup>j-o</sup>	1.55 <sup>l-n</sup>	1.58 <sup>j-o</sup>	1.67 <sup>j-m</sup>	2.02 <sup>d-h</sup>	1.55 <sup>l-n</sup>	1.77 <sup>h-l</sup>	1.85 <sup>g-j</sup>	1.58 <sup>j-o</sup>	1.58 <sup>j-o</sup>	2.02 <sup>d-h</sup>	0.70 <sup>s</sup>
F <sub>2</sub> 8.	1.58 <sup>j-o</sup>	1.34 <sup>n-p</sup>	1.28 <sup>o-q</sup>	1.55 <sup>l-n</sup>	1.77 <sup>h-l</sup>	1.46 <sup>m-p</sup>	1.67 <sup>j-m</sup>	1.87 <sup>f-k</sup>	1.34 <sup>n-p</sup>	1.67 <sup>j-m</sup>	1.46 <sup>m-p</sup>	1.34 <sup>n-p</sup>	1.58 <sup>j-o</sup>	1.55 <sup>l-n</sup>	0.70 <sup>s</sup>
F <sub>2</sub> 9.	1.28 <sup>o-q</sup>	1.34 <sup>n-p</sup>	1.58 <sup>j-o</sup>	1.28 <sup>o-q</sup>	1.85 <sup>g-j</sup>	1.34 <sup>n-p</sup>	1.46 <sup>m-p</sup>	1.95 <sup>e-i</sup>	1.55 <sup>l-n</sup>	1.28 <sup>o-q</sup>	1.77 <sup>h-l</sup>	1.46 <sup>m-p</sup>	1.55 <sup>l-n</sup>	1.87 <sup>f-k</sup>	1.05 <sup>q-r</sup>
F <sub>2</sub> 10.	1.55 <sup>l-n</sup>	1.58 <sup>j-o</sup>	1.46 <sup>m-p</sup>	1.58 <sup>j-o</sup>	1.85 <sup>g-j</sup>	1.55 <sup>l-n</sup>	1.55 <sup>l-n</sup>	2.03 <sup>d-h</sup>	1.55 <sup>l-n</sup>	1.67 <sup>j-m</sup>	1.55 <sup>l-n</sup>	1.58 <sup>j-o</sup>	1.58 <sup>j-o</sup>	1.87 <sup>f-k</sup>	0.70 <sup>s</sup>
F <sub>2</sub> 11.	1.46 <sup>m-p</sup>	1.05 <sup>q-r</sup>	1.46 <sup>m-p</sup>	1.58 <sup>j-o</sup>	1.87 <sup>f-k</sup>	1.58 <sup>j-o</sup>	1.22 <sup>p-q</sup>	1.85 <sup>g-j</sup>	1.28 <sup>o-q</sup>	1.67 <sup>j-m</sup>	1.77 <sup>h-l</sup>	1.46 <sup>m-p</sup>	1.67 <sup>j-m</sup>	1.55 <sup>l-n</sup>	0.70 <sup>s</sup>
Gökçe	1.58 <sup>j-o</sup>	1.28 <sup>o-q</sup>	1.58 <sup>j-o</sup>	1.28 <sup>o-q</sup>	1.87 <sup>f-k</sup>	1.58 <sup>j-o</sup>	1.67 <sup>j-m</sup>	1.34 <sup>n-p</sup>	1.46 <sup>m-p</sup>	1.22 <sup>p-q</sup>	1.58 <sup>j-o</sup>	1.67 <sup>j-m</sup>	1.58 <sup>j-o</sup>	1.05 <sup>q-r</sup>	0.70 <sup>s</sup>
Uzunlu 99	1.22 <sup>p-q</sup>	0.87 <sup>r-s</sup>	0.87 <sup>r-s</sup>	1.67 <sup>j-m</sup>	1.77 <sup>h-l</sup>	1.67 <sup>j-m</sup>	1.58 <sup>j-o</sup>	1.58 <sup>j-o</sup>	1.46 <sup>m-p</sup>	1.58 <sup>j-o</sup>	0.87 <sup>r-s</sup>	1.67 <sup>j-m</sup>	1.22 <sup>p-q</sup>	11.58 <sup>j-o</sup>	0.70 <sup>s</sup>
Er 99	0.87 <sup>r-s</sup>	1.55 <sup>l-n</sup>	1.55 <sup>l-n</sup>	1.34 <sup>n-p</sup>	1.22 <sup>p-q</sup>	1.22 <sup>p-q</sup>	1.55 <sup>l-n</sup>	0.87 <sup>r-s</sup>	1.55 <sup>l-n</sup>	1.55 <sup>l-n</sup>	1.55 <sup>l-n</sup>	1.46 <sup>m-p</sup>	1.58 <sup>j-o</sup>	1.05 <sup>q-r</sup>	0.70 <sup>s</sup>
Dikbaş	0.87 <sup>r-s</sup>	0.87 <sup>r-s</sup>	1.34 <sup>n-p</sup>	1.28 <sup>o-q</sup>	10.87 <sup>r-s</sup>	0.87 <sup>r-s</sup>	1.34 <sup>n-p</sup>	0.87 <sup>r-s</sup>	1.28 <sup>o-q</sup>	1.22 <sup>p-q</sup>	1.34 <sup>n-p</sup>	1.22 <sup>p-q</sup>	1.28 <sup>o-q</sup>	1.05 <sup>q-r</sup>	0.70 <sup>s</sup>
C.V.(%)	10.31														

Çizelge 4.6'da görüldüğü üzere; denemede tüm ortam ve genotipler üzerinde embriyonik kallus oluşumu gözlenmemiştir. Ön soğuk uygulamaları arasında kıyaslama yapıldığında en fazla embriyonik kallus 2.54 adet ile + 4 °C'de 4 gün soğuk uygulamasında, hormon kombinasyonu 6,00 mg/L 2,4-D + 0,50 mg/L BAP içeren EMM 2 no'lu ortamda F<sub>2</sub> 1. popülasyonunda elde edilirken en az embriyonik kallus 0,70 adet ile + 4 °C'de 7 gün hormon içermeyen EMM 4 no'lu ortamda elde edilmiştir.

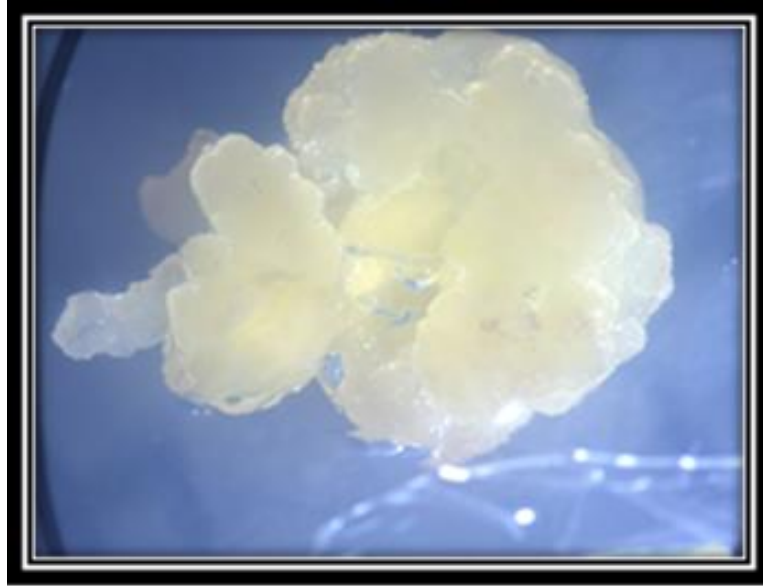
Ön soğuk uygulaması yapılmayan anterlerden; en fazla embriyonik kallus 1.95 adet ile 4,00 mg/L Dikamba+ 0,50 mg/L BAP içeren EMM 3 ortamında F<sub>2</sub> 6 popülasyonunda elde edilmiştir. Bunu, 1.87 adet ile 6,00 mg/L 2,4 D + 0,50 mg/L BAP içeren EMM 2 ortamında F<sub>2</sub> 1 popülasyonu izlemiştir. En az embriyonik kallus 0.87 adet ile hormon içermeyen (EMM 0) kontrol ortamında Er 99 ve Dikbaş çeşitlerinde elde edilmiştir.

Dört gün ön soğuk uygulamasında, en fazla embriyonik kallus 2.54 adet ile 6,00 mg/L 2,4-D + 0,50 mg/L BAP içeren EMM 2 ortamında F<sub>2</sub> 1 popülasyonunda bulunmuştur. Bunu, 2.47 adet ile EMM 2 ortamında F<sub>2</sub> 6 popülasyonu takip etmiştir.

Yedi gün ön soğuk uygulamasında; en fazla embriyonik kallus 1.87 adet ile 6,00 mg/L 2,4- D + 0,50 mg/L BAP içeren EMM 2 ortamında F<sub>2</sub> 5 popülasyonunda elde edilmiştir. Bunu, 1.77 adet ile yine aynı ortamda F<sub>2</sub> 6 popülasyonu takip etmiştir. En az embriyonik kallus 0.70 adet ile EMM4 ortamında elde edilmiştir.



Şekil 4.5 EDM 2 ortamından EMM 3 ortamına aktarıldıktan 1 hafta sonra F<sub>2</sub> kademesindeki 6. popülasyona ait olgunlaşmış globular safhadaki embriyonik kallus



Şekil 4.6 EDM 3 ortamından EMM 2 ortamına aktarıldıktan 3 hafta sonra F<sub>2</sub> kademesindeki 2. popülasyona ait embriyonik kallus

#### 4.4 Serada Yetiştirilen Donör Bitkilerde Olgunlaşmış Embriyonik Kallus Oluşumu

Embriyo olgunlaştırma ortamı (EMM) embriyoları olgunlaştırarak çimlenmeye teşvik etmek amacıyla oluşturulmuştur. Tesadüf parsellerinde faktöriyel deneme deseni kullanılarak 1'i kontrol olmak üzere 5 farklı EMM ortamı hazırlanmıştır. Oksinlerin embriyo oluşumunu ve olgunlaşmasını teşvik ettiği bilinmektedir (Panchangam 2014). Hazırlanan EMM ortamlarında embriyoların olgunlaşmasına teşvik etmek amacıyla oksin hormon miktarları yüksek tutulmuştur. EDM ortamında oluşan embriyonik kalluslar 1 ay sonunda olgunlaştırılmak üzere farklı embriyo olgunlaştırma ortamlarına (EMM) aktarılmıştır.

Sera koşullarında yetişen nohut genotiplerinde, farklı ön soğuk uygulaması ve besin ortamlarının olgunlaşmış embriyonik kallus oluşumu etkilerine ilişkin varyans analizi yapılmış, sonuçlar Çizelge 4.7' de verilmiştir.

Çizelge 4.7 Farklı uygulamaların olgunlaşmış embriyonik kallus oluşumu etkilerine ilişkin varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	S.D.	Kareler Toplamı	F
Genotip	14	9,951	25,294*
Ortam	4	22,015	195,850*
Soğuk	2	10,950	194,833*
Ortam x Soğuk	8	4,840	21,531*
Ortam x Genotip	56	6,422	4,081*
Soğuk x Genotip	28	3,780	4,803*
Soğuk x Genotip x Ortam	112	7,538	2,395*
HATA	461	12,168	

\* 0.01 düzeyinde önemli

Elde edilen sonuçlara göre; kültür ortamları, ön soğuk uygulamaları ve genotipler arasında 0,01 düzeyinde önemli farklılıklar belirlenmiştir. OrtamxSoğuk, ortam xgenotip, soğuk x genotip interaksyonları 0,01 düzeyinde farklılıklar bulunmuştur. Denemede ele alınan faktörlerin üçlü interaksyonu da (soğuk\*genotip\*ortam) 0,01 düzeyinde önemli çıkmıştır (Çizelge 4.7). Bu farklılıkların önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan çoklu karşılaştırma testi sonuçları Çizelge 4.8’de verilmiştir.



Çizelge 4.8 Farklı ön soğuk uygulaması ve besin ortamlarının, nohut genotiplerinde embriyo olgunlaştırma ortamlarında olgunlaşmış embriyonik kallus oluşumu etkilerine ilişkin çoklu karşılaştırma testi sonuçları (adet)

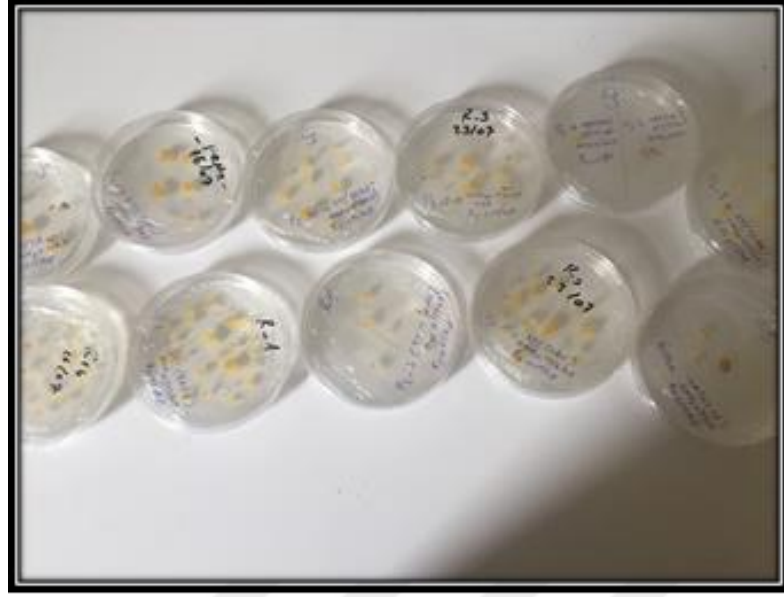
Genotip	EMM 0			EMM 1			EMM 2			EMM 3			EMM 4		
	Kontrol	4	7	Kontrol	4	7	Kontrol	4	7	Kontrol	4	7	Kontrol	4	7
F <sub>2</sub> 1.	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,88 <sup>cd</sup>	0,88 <sup>cd</sup>	0,71 <sup>d</sup>	1,22 <sup>ab</sup>	0,88 <sup>cd</sup>	0,96 <sup>b-d</sup>	0,88 <sup>cd</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,88 <sup>cd</sup>	1,22 <sup>ab</sup>	0,71 <sup>d</sup>
F <sub>2</sub> 2.	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,88 <sup>cd</sup>	1,22 <sup>ab</sup>	0,88 <sup>cd</sup>	1,22 <sup>ab</sup>	1,05 <sup>bc</sup>	1,05 <sup>bc</sup>	1,22 <sup>ab</sup>	0,97 <sup>b-d</sup>	1,22 <sup>ab</sup>	0,88 <sup>cd</sup>
F <sub>2</sub> 3.	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,88 <sup>cd</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,97 <sup>b-d</sup>	0,88 <sup>cd</sup>	1,05 <sup>bc</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,88 <sup>cd</sup>	0,88 <sup>cd</sup>
F <sub>2</sub> 4.	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	1,05 <sup>bc</sup>	0,88 <sup>cd</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,88 <sup>cd</sup>	1,05 <sup>bc</sup>	1,05 <sup>bc</sup>	0,88 <sup>cd</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,88 <sup>cd</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>
F <sub>2</sub> 5.	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,88 <sup>cd</sup>	1,22 <sup>ab</sup>	0,97 <sup>b-d</sup>	0,88 <sup>cd</sup>	1,22 <sup>ab</sup>	1,22 <sup>ab</sup>	1,05 <sup>bc</sup>	1,05 <sup>bc</sup>	0,88 <sup>cd</sup>	1,22 <sup>ab</sup>	1,05 <sup>bc</sup>	1,05 <sup>bc</sup>
F <sub>2</sub> 6.	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	1,22 <sup>ab</sup>	1,22 <sup>ab</sup>	0,71 <sup>d</sup>	1,05 <sup>bc</sup>	1,22 <sup>ab</sup>	1,05 <sup>bc</sup>	1,05 <sup>bc</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	1,22 <sup>ab</sup>	0,97 <sup>b-d</sup>
F <sub>2</sub> 7.	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,88 <sup>cd</sup>	0,88 <sup>cd</sup>	0,71 <sup>d</sup>	1,34 <sup>a</sup>	0,88 <sup>cd</sup>	0,88 <sup>cd</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	1,05 <sup>bc</sup>	0,71 <sup>d</sup>
F <sub>2</sub> 8.	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	1,34 <sup>a</sup>	0,88 <sup>cd</sup>	0,88 <sup>cd</sup>	0,88 <sup>cd</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,88 <sup>cd</sup>	0,88 <sup>cd</sup>
F <sub>2</sub> 9.	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	1,34 <sup>a</sup>	0,88 <sup>cd</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,88 <sup>cd</sup>	0,71 <sup>d</sup>	1,05 <sup>bc</sup>	0,71 <sup>d</sup>
F <sub>2</sub> 10.	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	1,34 <sup>a</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,88 <sup>cd</sup>
F <sub>2</sub> 11.	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	1,22 <sup>ab</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,88 <sup>cd</sup>	0,71 <sup>d</sup>
Gökçe	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,88 <sup>cd</sup>	0,71 <sup>d</sup>
Uzunlu 99	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>
Er 99	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>
Dikbaş	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>	0,71 <sup>d</sup>
C.V.(%)	14.06														

Çizelge 4.8’de belirtilen bulgulara göre, hazırlanan EMM ortamlarında, genotiplerin tümünde embriyonik kallus oluşumu gözlenmiştir. Ön soğuk uygulamaları arasında kıyaslama yapıldığında, 4 gün ön soğuk uygulaması sonucu en fazla embriyonik kallus 1,34 adet ile 6,00 mg/L 2,4-D + 0.50 mg/L BAP içeren EMM 2 no’lu ortamda F<sub>2</sub> kademesindeki 7,8,9 ve 10 popülasyonlarında, en düşük embriyonik kallus 0,71 adet ile (EMM 0) kontrol ortamında elde edilmiştir.

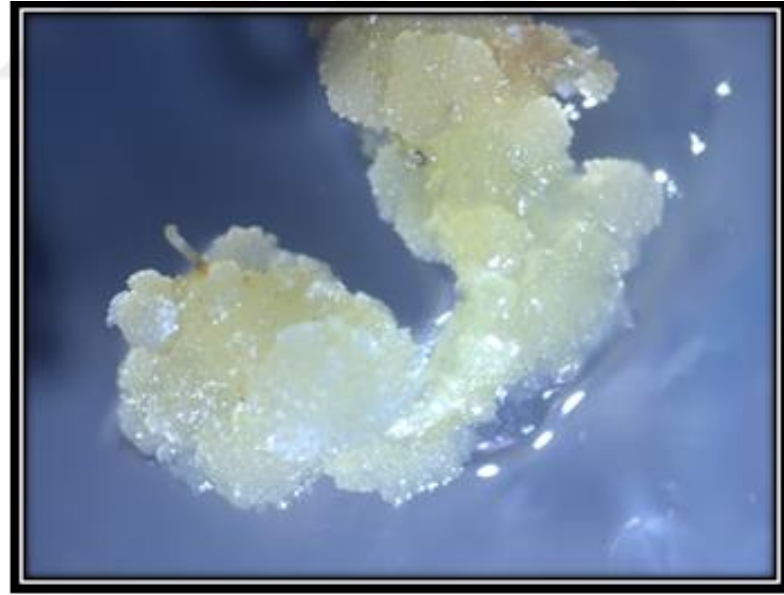
Ön soğuk uygulaması yapılmayan anterlerden en fazla embriyonik kallus 1,34 adet ile 6,00 mg/L 2,4 -D + 0,50 mg/L BAP içeren EMM 2 ortamında, F<sub>2</sub> kademesindeki 6 popülasyonunda elde edilmiştir. Bunu, 1,22 değeri ile EMM 2 ortamında F<sub>2</sub> 2 popülasyonu ve 4,00 mg/L Picloram + 0,50 mg/L BAP içeren EMM 4 ortamında F<sub>2</sub> 5 popülasyonu takip etmiştir. En az embriyonik kallus 0,71 adet ile (EMM 0) kontrol ortamında tüm F<sub>2</sub> popülasyonları ile Gökçe, Uzunlu 99, Er 99 ve Dikbaş çeşitlerinde elde edilmiştir.

Dört gün ön soğuk uygulamasında en fazla embriyonik kallus 1,34 adet ile 6,00 mg/L 2,4- D + 0,50 mg/L BAP içeren EMM 2 ortamında, F<sub>2</sub> kademesindeki 7,8,9 ve 10 popülasyonlarında elde edilmiştir. Bunu, 1,22 adet ile EMM 2 ortamında ve 4,00 mg/L Pikloram + 0.50 mg/L BAP içeren EMM 4 ortamında, F<sub>2</sub> 2 ve 6 popülasyonları takip etmiştir. En az embriyonik kallus 0,71 adet ile (EMM 0) kontrol ortamında, tüm F<sub>2</sub> popülasyonları ile Gökçe, Uzunlu 99, Er 99 ve Dikbaş çeşitlerinde elde edilmiştir.

Yedi gün ön soğuk uygulamasında en fazla embriyonik kallus 1,22 adet ile F<sub>2</sub> kademesindeki 6 popülasyonunda 4,00 mg/L IAA+ 0,50 mg/L BAP ve 6,00 mg/L 2,4-D + 0,50 mg/L BAP içeren EMM 1 ve EMM 2 ortamlarında F<sub>2</sub> 2 popülasyonunda elde edilmiştir. En az embriyonik kallus 0,71 adet ile hormon içermeyen (EMM 0) kontrol ortamında tüm F<sub>2</sub> popülasyonları ile Gökçe, Uzunlu 99, Er 99 ve Dikbaş çeşitlerinde görülmüştür.



Şekil 4.7 Farklı EMM ortamları ve farklı nohut genotiplerinde kültüre alındıktan 2 hafta sonra olgunlaşmaya başlamış embriyonik kalluslar



Şekil 4.8 F<sub>2</sub> kademesindeki 4 popülasyonunda, EMM 2 ortamında, kültüre alındıktan 3 hafta sonra globüler embriyonik kallus oluşumu

#### 4.5 Tarla Koşullarında Yetiştirilen Donör Bitkilerde, Olgunlaşmış Embriyonik Kallustan Sürgün Rejenerasyonu Oluşumu

Embriyogenik kalluslardan bitki rejenerasyonunu gerçekleştirmek amacıyla kalluslar farklı konsantrasyonlarda hazırlanan bitki rejenerasyon ortamlarına (PRM) aktarılmıştır. Tesadüf parsellerinde faktöriyel deneme deseni kullanılarak 1'i kontrol olmak üzere 21 farklı rejenerasyon ortamı (PRM) hazırlanmıştır.

EDM ve EMM ortamlarında yaklaşık 8 haftalık kültür aşamasından sonra gelişen embriyoların tamamen olgunlaşmasıyla, globüler, kalp, torpedo ve kotiledon safhaları sırasıyla mikroskop altında gözlemlenmiştir. Gelişen embriyonik kallusların kültüre alınmasından yaklaşık 12 hafta sonra embriyolarda çimlenme ve sürgün oluşumu meydana gelmiştir.

Kallus parçaları üzerinde oluşan sürgünler sayılarak bitki rejenerasyonu tespit edilmiştir. Kallusların bulunduğu petripler 16 saat ışık fotoperiyodunda (50  $\mu$ mol s<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup>) %70 nem bulunan iklim dolaplarında 24 °C'de tutulmuştur.

Tarla koşullarında yetişen nohut genotiplerinde, farklı besin ortamlarının sürgün rejenerasyonu oluşumu etkilerine ilişkin varyans analizi yapılmış, sonuçlar Çizelge 4.9'da verilmektedir.

Çizelge 4.9 Farklı uygulamaların sürgün rejenerasyon oluşumu etkilerine ilişkin varyans analiz sonuçları

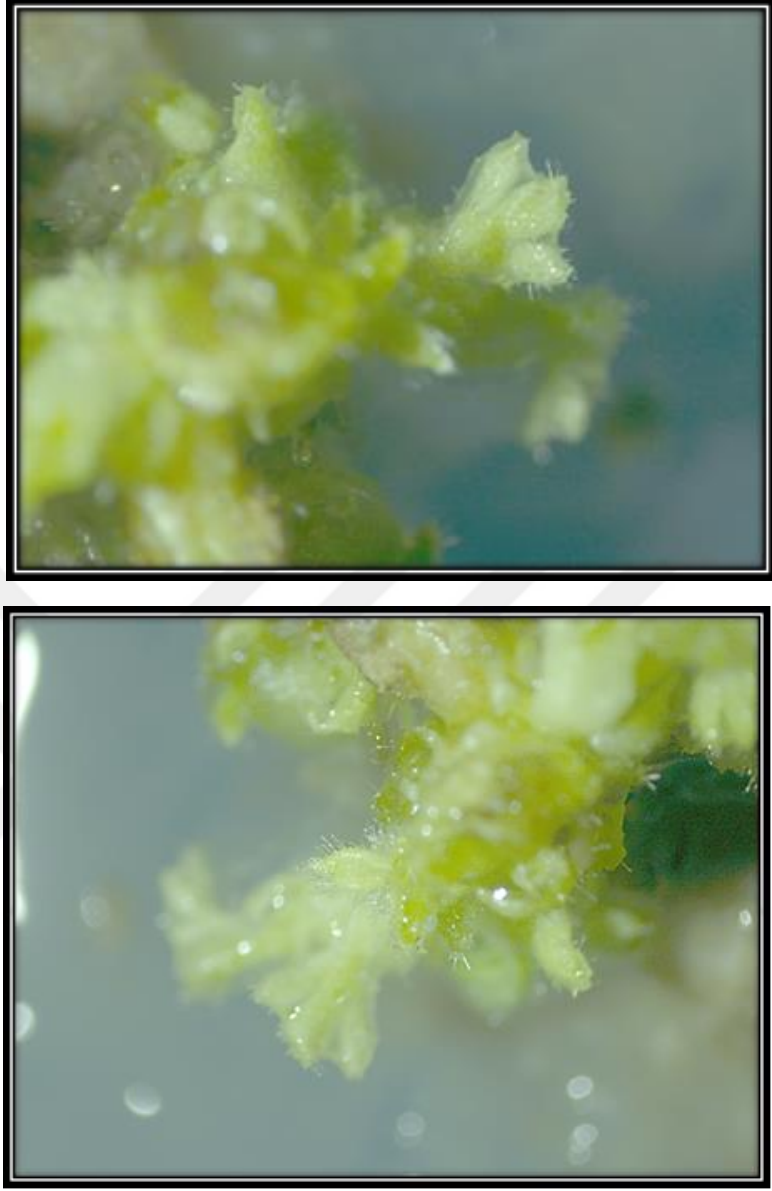
Varyasyon Kaynakları	S.D.	Kareler Toplamı	F
Genotip	14	12,092	56,151*
Ortam	21	8,371	58,308*
Genotip x Ortam	294	17,429	5,781*
Toplam	989	44,660	
HATA	660	6,768	0,010

\*0.01 düzeyinde önemli.

Çizelge 4.9’da belirtildiği üzere, kültür ortamları ve genotipler arasındaki farklılıklar 0,01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Ortam X genotip uygulamaları arasındaki interaksyonda 0,01 düzeyinde farklılıklar gözlenmiştir (Çizelge 4.8). Bu farklılıkların önem düzeyini belirlemek amacıyla yapılan çoklu karşılaştırma testi sonuçları Çizelge 4.10’da verilmiştir.



Şekil 4.9 PRM 3’ te kültüre alındıktan 16 hafta sonra F<sub>2</sub> kademesindeki 5. Popülasyonun embriyonik kallus oluşturan anterlerinden sürgün rejenerasyonu



Şekil 4.10 PRM 7' de kültüre alındıktan 12 hafta sonra F<sub>2</sub> kademesindeki 3. Popülasyonun embriyonik kallus oluşturan anterlerinden sürgün rejenerasyonu

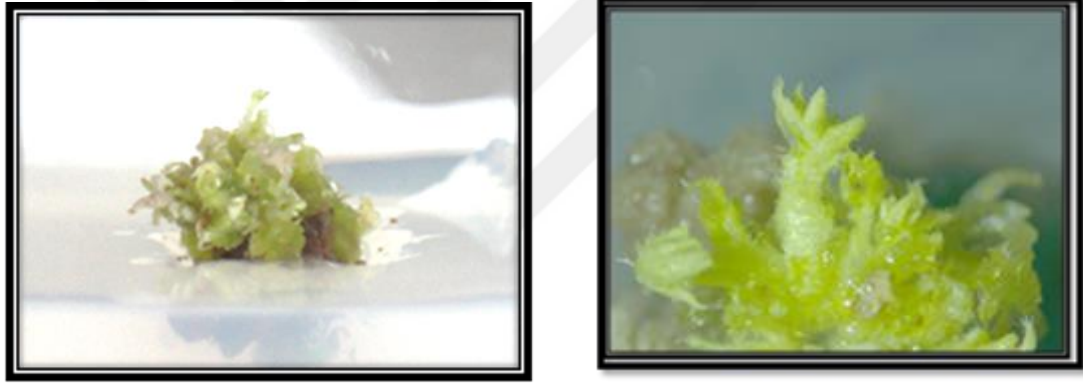
Çizelge 4.10 Farklı besin ortamlarının, nohut genotiplerinde sürgün rejenerasyon oluşumu etkilerine ilişkin çoklu karşılaştırma testi sonuçları

Genotip	REJENERASYON ORTAMLARI (PRM 0- PRM 21)																					Ort.		
	PRM-0	PRM-1	PRM-2	PRM-3	PRM-4	PRM-5	PRM-6	PRM-7	PRM-8	PRM-9	PRM-10	PRM-11	PRM-12	PRM-13	PRM-14	PRM-15	PRM-16	PRM-17	PRM-18	PRM-19	PRM-20		PRM-21	
F <sub>2</sub> 1.	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,87 <sup>k</sup>	2,11 <sup>d</sup>	0,87 <sup>k</sup>	1,22 <sup>gh</sup>	1,22 <sup>gh</sup>	1,77 <sup>bc</sup>	0,87 <sup>k</sup>	0,87 <sup>k</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	1,22 <sup>gh</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,87 <sup>k</sup>	0,707 <sup>l</sup>	1,22 <sup>gh</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	1,22 <sup>gh</sup>	0,707 <sup>l</sup>	1,22 <sup>gh</sup>	0,996	
F <sub>2</sub> 2.	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,87 <sup>k</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	1,22 <sup>gh</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,738	
F <sub>2</sub> 3.	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	1,28 <sup>gh</sup>	0,87 <sup>k</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	1,05 <sup>y</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	1,05 <sup>y</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,772	
F <sub>2</sub> 4.	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,87 <sup>k</sup>	0,99 <sup>ak</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	1,05 <sup>y</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,743	
F <sub>2</sub> 5..	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	1,17 <sup>bu</sup>	1,87 <sup>b</sup>	0,87 <sup>k</sup>	1,34 <sup>fe</sup>	1,05 <sup>y</sup>	1,85 <sup>b</sup>	0,707 <sup>l</sup>	1,22 <sup>gh</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	1,05 <sup>y</sup>	0,707 <sup>l</sup>	1,05 <sup>y</sup>	1,22 <sup>gh</sup>	0,87 <sup>k</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,87 <sup>k</sup>	0,938
F <sub>2</sub> 6.	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	1,58 <sup>de</sup>	0,707 <sup>l</sup>	1,05 <sup>y</sup>	0,707 <sup>l</sup>	1,67 <sup>cd</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,87 <sup>k</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,813	
F <sub>2</sub> 7.	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	1,05 <sup>y</sup>	0,87 <sup>k</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	1,22 <sup>gh</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,753	
F <sub>2</sub> 8.	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,87 <sup>k</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,714	
F <sub>2</sub> 9.	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	1,22 <sup>gh</sup>	1,05 <sup>y</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,746	
F <sub>2</sub> 10.	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	1,46 <sup>d</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,741	
F <sub>2</sub> 11.	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,87 <sup>k</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,714	
Gökçe	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,87 <sup>k</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	1,22 <sup>gh</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	1,05 <sup>y</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,753	
Uzunlu 99	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707	
Er 99	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	
Dikbaş	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	0,707 <sup>l</sup>	
C.V. (%)	11.9																							

Çizelge 4.10’da görüldüğü gibi, bütün uygulamalar arasında en fazla sürgün 2.11 adet ile 1,00 mg/L BAP + 0,03 mg/L NAA içeren PRM 3 ortamında, F<sub>2</sub> kademesindeki 1 popülasyonunda elde edilmiştir. En az sürgün 0.707 adet ile PRM 0,1,7,10,11,13,18 ve 20 ortamlarında tüm F<sub>2</sub> kademesindeki popülasyonlar ile Gökçe, Uzunlu 99, Er 99 ve Dikbaş çeşitlerinde belirlenmiştir.

Yukarıda belirtilen en yüksek sürgün sayısını, PRM 3 (1.87) ve PRM 7 no’lu ortamlarda (1.85) F<sub>2</sub> kademesindeki 5.popülasyonu takip etmiştir. Bu sonuçları PRM 7 no’lu ortamda 1.77 değeri ile F<sub>2</sub> 1.popülasyonu ve 1.67 değeri ile F<sub>2</sub> 6.popülasyonu izlemiştir.

Diğer bütün uygulamalara ait sonuçlar (2.11 –0.707) bu iki değer arasında yer almıştır.



Şekil 4.11 PRM 6’ de kültüre alındıktan 10 hafta sonra F<sub>2</sub> kademesindeki 6. popülasyonun embriyonik kallus oluşturan anterlerinden sürgün rejenerasyonu

Çizelge 4.10’da belirtildiği üzere; en az sürgün 0.707 adet ile PRM 0 (kontrol ortamı), PRM 1 (0,25 mg/L BAP + 0,01 mg/L NAA), PRM 10 (4,00 mg/L BAP + 0,05 mg/L IBA), PRM 11 (0,25 mg/L BAP +0,01 mg/L TDZ ), PRM 13 (1,00 mg/L BAP+0,05 mg/L TDZ), PRM 18 (0,05 mg/L BAP + 1,00 mg/l Kinetin) ve PRM 20 (0,05 mg/L NAA+ 1,00 mg/L Zeatin) ortamında tüm F<sub>2</sub> kademesindeki popülasyonlarda ve Gökçe, Uzunlu 99, Er 99, Dikbaş çeşitlerinde saptanmıştır.



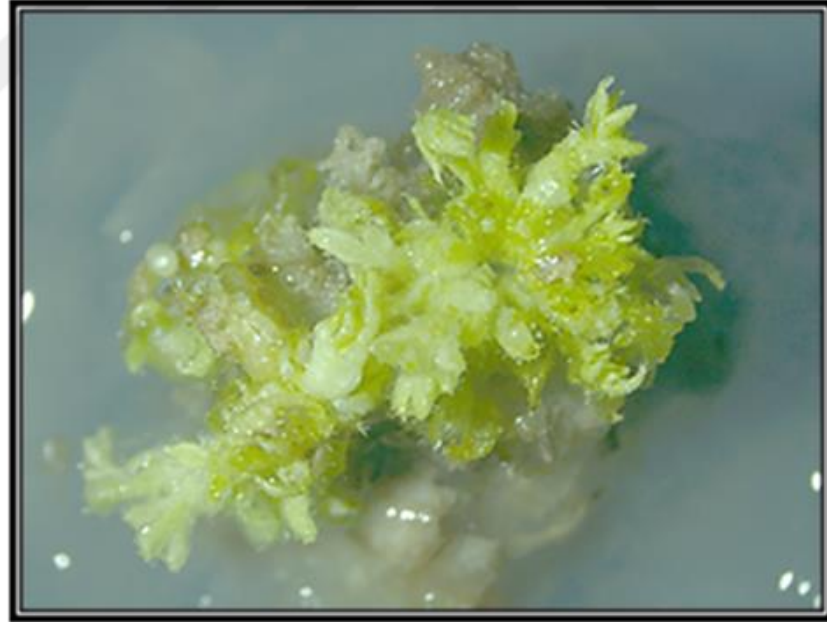
Şekil 4.12 PRM 12' de kültüre alındıktan 8 hafta sonra Gökçe çeşidinin embriyonik kallus oluşturan anterlerinden sürgün rejenerasyonu



Şekil 4.13 PRM 6' da kültüre alındıktan 4 hafta sonra F<sub>2</sub> kademesindeki 6. Popülasyonun embriyonik kallus oluşturan anterlerinden sürgün rejenerasyonu



Şeki 4.14 PRM 1' de kültüre alındıktan 16 hafta sonra F<sub>2</sub> kademesindeki 2. Popülasyonun embriyonik kallus oluşturan anterlerinden sürgün rejenerasyonu



Şekil 4.15 PRM 7' de kültüre alındıktan 14 hafta sonra F<sub>2</sub> kademesindeki 6. Popülasyonun embriyonik kallus oluşturan anterlerinden sürgün rejenerasyonu



Şekil 4.16 PRM 3' de kültüre alındıktan 18 hafta sonra F<sub>2</sub> kademesindeki 5. popülasyonun embriyonik kallus oluşturan anterlerinden sürgün rejenerasyonu



Şekil 4.17 PRM 3' te kültüre alındıktan 20 hafta sonra F<sub>2</sub> kademesindeki 6. Popülasyonun embriyonik kallus oluşturan anterlerinden sürgün rejenerasyonu

#### **4.3.2 Sera koşullarında yetiştirilen donör bitkilerde, olgunlaşmış embriyonik kallustan sürgün rejenerasyonu oluşumu**

Embriyogenik kalluslardan bitki rejenerasyonunu gerçekleştirmek amacıyla kalluslar farklı konsantrasyonlarda hazırlanan bitki rejenerasyon ortamlarına (PRM) aktarılmıştır. Birtanesi kontrol olmak üzere 21 farklı rejenerasyon ortamı (PRM) hazırlanmıştır.

Olgunlaşmış embriyonik kallusların bulunduğu petrilere 16 saat ışık fotoperiyodunda (50  $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ) %70 nemin bulunduğu iklim dolaplarında 24 °C’de tutulmuştur.

Sera koşullarında yetişen donör bitkilerde izelge 4.3’de belirtildiği gibi oldukça düşük oranda embriyonik kallus oluşumu gözlemlenmiş, buna bağlı olarak hiçbir genotipte ve kùltür koşulunda sürgün rejenerasyonu elde edilememiştir. Rejenerasyon (PRM) ortamlarında sürgün oluşturma kriterinin göz önüne bulundurulması sebebiyle sürgün oluşumuna ilişkin istatistik analiz yapılamamıştır.

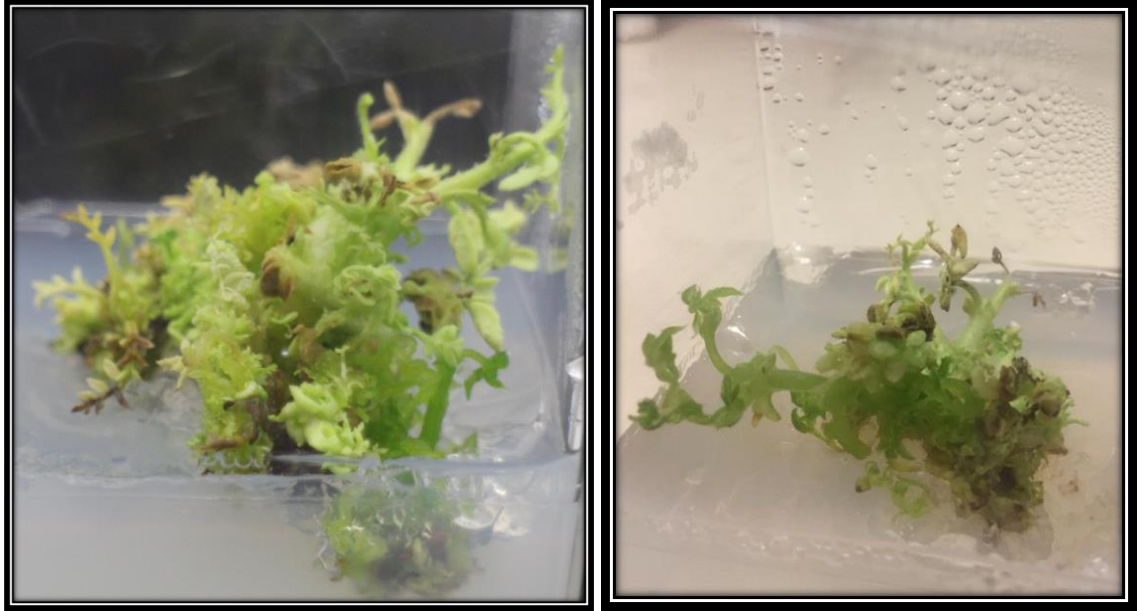
#### **4.4. Köklendirme Ortamlarında (R) Elde Edilen Sonuçlar**

Rejenere olan sürgünler hormonsuz ve farklı hormon konsantrasyonlarında hazırlanan R1 (hormonsuz), R2 (IAA: 0,25 mg/ L), R3 (IAA: 0,50 mg/ L), R4 (NAA: 0,25 mg/ L), R5 (NAA: 0,50 mg/L), R6 (IBA: 0,25 mg/L), R7 (IBA: 0,50 mg/L) + ½ MS bulunduran besin ortamlarında kùltüre alınmıştır.

Hormonsuz ortama ve IAA, IBA oksin hormonlarını bulunduran köklenme ortamlarına alınan sürgünlerde, yaklaşık 2-3 hafta sonra boğum aralarında uzama ve yan dallarda yeni, taze sürgünler meydana gelmiştir. Buna rağmen; NAA bulunduran ortamlar sürgünleri köklenmeye teşvik etmemiş, kallus oluşumuna sebep olmuştur. Oksin hormonu içermeyen köklendirme ortamlarında 4 hafta sonra büyüme durmuş, bazı sürgünlerde kurumalar meydana gelmiştir. Farklı miktarlarda IAA ve IBA içeren ortamlarda bulunan sürgünlerde köklenme elde edilememiş, fakat sürgünler büyüme ve gelişmeye devam etmiştir.



Şekil 4.18 R 6 no'lu oksin hormonu içermeyen köklendirme ortamında kültüre alındıktan 4 hafta sonra F<sub>2</sub> kademesindeki 6. popülasyon



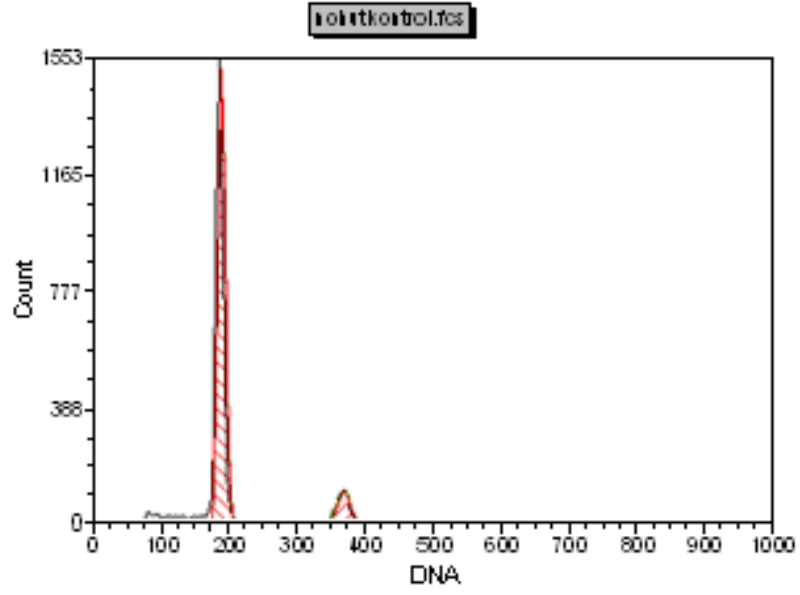
Şekil 4.19 R 2 no'lu köklendirme ortamında kültüre alındıktan 4 hafta sonra F<sub>2</sub> kademesindeki 5. popülasyon



Şekil 4.20 R 0'nolu oksin hormonu içermeyen köklendirme ortamında kültüre alındıktan a) 3 hafta sonra b) 5 hafta sonra F<sub>2</sub> kademesindeki 8. popülasyonu

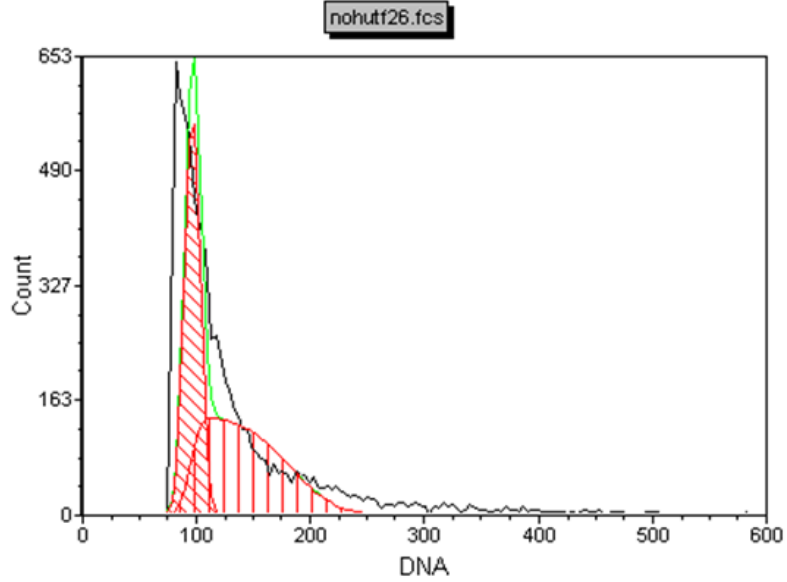
#### 4.5 Gelişen Sürgünlerde Ploidi Analizi

Çalışmada F<sub>2</sub> kademesindeki 11 farklı melez kombinasyonu ve 4 nohut çeşidinin ploidi düzeylerini belirlemek amacıyla ploidy analyser cihazı kullanılmıştır. Analizler sürgün gelişimi olan popülasyonlarda ayrı ayrı yapılmıştır. Analizlerde ploidi seviyesi daha önceden bilinen Azkan nohut çeşidi standart olarak kullanılmıştır. Anter kültürü çalışmaları sonucunda elde edilen sürgünlerden çok az sayıda haploid bitkicik oluşumu gerçekleşmiştir. Bitkiciklerin %50'sinde kromozom katlanması kendiliğinden gerçekleşmiştir.



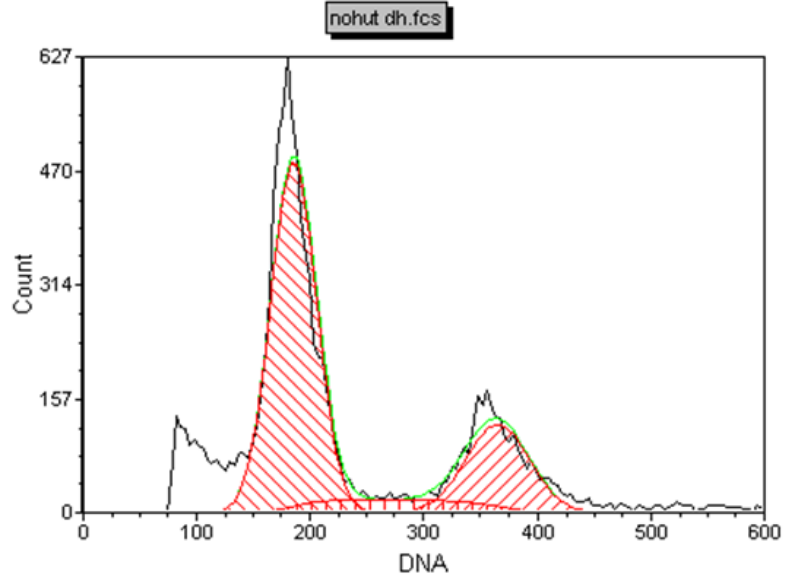
Şekil 4.21 Diploid Azkan kontrol çeşidi DNA ploidi seviyesi

Şekil 4.21'e göre diploid olduğu bilinen Azkan kontrol çeşidinde olduğu gibi DNA seviyesi 200'de pik verdiği diploid olduğu bilinmektedir.



Şekil 4.22 Haploid F<sub>2</sub> kademesindeki 6 popülasyonu DNA ploidi seviyesi

Şekil 4.22'e göre; DNA seviyesi 100 'de pik verdiğinde haploid olduğu bilinmektedir.



Şekil 4.3 Diploid F<sub>2</sub> kademesindeki 8 popülasyonu DNA ploidi seviyesi

## 5. TARTIŞMA

Anter kültürü tekniği ile nohutta yapılmış başarılı çalışmalar bulunmasına rağmen, *in vitro* rejenerasyon kabiliyetinin oldukça düşük olduğu pek çok araştırmacı tarafından ifade edilmektedir (Vani ve Reddy 1996, Singh vd. 2002, Croser vd. 2009). Nohutta adventif sürgün rejenerasyon protokollerinin düşük tekrarlanabilirliği, karşılaşılan en önemli problemlerden biridir. Nohutta anter kültüründe düşük frekansta embriyonik kallus ve sürgün oluşumu rapor edilmekte, *in vitro*'da az sayıda elde edilen haploid ve katlanmış haploid bitkiciklerin aklimatizasyon ise son derece güçtür (Barna vd.1994).

Şimdiye kadar nohutta yapılan doku kültürü çalışmalarında kallus fazı olmaksızın direk organogenezis ve kallus ile elde edilen dolaylı organogenezis (Batra, 2002), kallus fazı olmaksızın somatik embriyogenezis (Murthy vd. 1996) ve kallus yoluyla elde edilen somatik embriyogenezis (Barna 1993) olmak üzere dört farklı metot uygulanmıştır. Bu çalışmada ise; öncelikle anterler üzerinde yüksek frekansta embriyonik kallus oluşumu hedeflenmiş, daha sonra somatik embriyogenezis yoluyla sürgün rejenerasyonu ve haploid bitkicikler elde edilmeye çalışılmıştır.

Anter kültürü tekniğinde başarıyı etkileyen en önemli faktörlerden biri donör bitkilerin fizyolojik koşullarıdır (Vasil, 1980; Chen, 1988; Hatipoğlu ve Sakin, 1996). Bu çalışmada farklı çevre koşullarında yetişen bitkilerden alınan mikrosporların tepkilerinin araştırılması amacıyla, bitkiler arazi ve sera koşullarında yetiştirilmiştir. Yapılan bazı çalışmalarda, arazi koşullarında yoğun ışık altında yetişen bitkilerden alınan anterlerin büyüme odası veya serada zayıf ışık altında büyüyen bitkilerin anterlerine göre androgenesiste başarı şansının daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Dodds ve Roberts 1985, Gürel vd. 1992, Hatipoğlu 1999). Elde ettiğimiz araştırma bulgularına göre; tarla koşullarında yoğun ışık altında yetişen bitkilerden alınan anterlerlerde kallus ve sürgün oluşum oranı kontrollü (sera) koşullarda yetişenlere göre daha fazla bulunmuştur. Serada yetiştirilen materyallerden alınan anterlerden hem daha az sayıda embriyonik kallus elde edilmiş hem de hiçbir şekilde sürgün rejenerasyonu sağlanamamıştır. Bunun nedenin yüksek sıcaklık başta olmak üzere, nem ve ışık faktörlerinin optimum seviyede karşılanamaması sonucu bitkilerin tomurcuk dönemi girmeden bitki boyunun kısa

kaldığı, sağlıklı çiçek ve tomurcuk oluşumu engellenmiş olduğu buna bağlı olarak da anterlerde sağlıklı polen ve mikrospor gelişiminin negatif etkilendiği düşünülmektedir.

Tüm bitkilerde ve nohut bitkisinde de anter kültüründe mikrospor gelişim evresi başarıyı belirleyen en önemli aşamadır (Grewal vd. 2009). Tomurcuklar alınırken çiçeklerinin anthesis devresine girmemiş ve birinci polen çalışmada mitozu aşamasına gelmiş (tek çekirdekli mikrosporları bulunduran) anterlerin olmasına ve sabahın erken saatlerinde toplanmasına dikkat edilmiştir. Denemede kullanılmış mikrosporların uninükleat aşamada olduğunu tespit etmek amacıyla mikroskop altında incelenmiştir. Antesis devresine girmekte olan tomurcuk (2 numaralı gelişme dönemi) androgenesiste en iyi sonucu vermiştir. Antesis devresine girmiş (3) veya geçirmiş olan (4 ve 5) tomurcuklarda androgenesis elde edilememiştir (Şekil 3.9). Eğer mikrosporlar gametofik moddan sporotofik moda geçmiş ve nişasta biriktirmeye başlamışsa uygun mikrospor evresi zamanının geçtiği anlaşılmaktadır. Ayrıca pratikte tomurcuğun ebatı ve şekline bakılarak fenotipik gözlem ile bu safha belirlenebilmektedir (Zamir vd. 1980).

Anter kültürü çalışmalarında, stres uygulamalarının gametofitik gelişmeyi engellediği ve mikrosporlarda polen embriyogenesisini tetiklemek için gerekli olduğu ileri sürülmüştür. Araştırmacılar tarafından donör bitkilerden alınan mikrospora uygulanan +4 °C'de 4 gün soğuk uygulamasının double haploid bitki üretimine daha iyi yanıt verdiğini belirtilmiştir (Altaf ve Ahmad 1986, Grewal vd. 2009, Croser vd. 2009). Söz konusu çalışmada tomurcuklar kontrol, 4 ve 7 gün 4 °C'de karanlıkta bekletilmiş hem tarla hem de sera materyallerinden alınan tomurcuklar 4 °C'de 4 gün karanlıkta bekletildiğinde embriyo geliştirme ve olgunlaştırma ortamlarında daha fazla sayıda kallus ve embriyo oluşumu gözlenmiştir. En az kallus sayısı ön soğuk uygulanmayan anterlerde izlenmiştir. Tomurcukları soğukta bekletmenin anterlerde farklılaşmaya ve kallus/sürgün oluşumuna olumlu etkisinin olduğu görülmüştür.

Doku kültürünün başarısında yüzey sterilizasyonu önemli bir faktör olup, yüksek oranda hücresel canlılık ve minimum seviyede kontaminasyonun sağlanması ile başarılabilmektedir. Anter kültürü çalışmalarında sterilizasyondan kaynaklanan sorunlar

sıkça yaşanmaktadır. Dezenfektanın yoğunluğu ve sterilizasyon süresi arttırıldığında, tomurcuklar ve dokular buna bağlı olarak anter canlılığı zarar görmekte anterlerde büyüme ve farklılaşma başlamamaktadır. Literatürlerde belirttiği gibi, çalışmada tomurcukların yüzey sterilizasyonu % 15 çamaşır suyu (Ace, %5 NaOCl) ile 15 dk. manyetik karıştırıcıda karıştırılmış, daha sonra 5 × 3 dk saf su ile durulama yapılmıştır. Genel anlamda uygulanan bu sterilizasyon yöntemi ile bakteriyel ve fungal bulaşıklık görülmezken, dokularda canlılığın büyük ölçüde devam ettiği gözlemlenmiştir.

Bitkilerde adventif sürgün rejenerasyonu farklı genler tarafından kontrol edilmekte, elde edilecek başarı genotip ile yakından ilişkilidir. Anter kültürünün başarısı türlere göre değişmekle birlikte aynı türe ait farklı çeşit/genotiplerde bile farklılıklar göstermektedir. Genotipe göre besin ortam içeriğinin ayrı ayrı optimize edilmesi ve her bir genotipe özgü rejenerasyon protokolünün geliştirilmesi gerektiğini belirtilmiştir (Szakacs vd. 1989).

Nohut anter kültürü tekniğinde büyüme ve gelişmeyi engelleyiciler, fenolik bileşikler, inkübasyon koşulları ve bir takım toksik maddeler mikrospor gelişimini olumsuz yönde etkilemektedir. Oksijen ile fenolik maddelerin birleşmesi sırasında oksidasyon yani bitki dokularında kararmalar ve hücre ölümleri meydana gelmektedir. Bu durumda oksidasyonu engellemek için besin ortamına aktif kömür ilave edilmekte böylece ortamda oluşan toksik bileşikler soğurularak hücre ve doku ölümleri önlenmektedir (Hatipoğlu 1999, Altındal 2005). Özellikle somatik embriyogenesi engelleyen, embriyo olgunlaşmasına yardımcı olan ABA'nın (absisik asit) ortama eklenmesi ile toksik etki önlenmektedir (Johansson 1983). Bu çalışmada, kallusların toksik madde salınımını aza indirmek amacıyla, embriyonik kallus olgunlaştırma ortamlarına, Grewal vd. (2009) tarif ettiği gibi, 1,00 mg/l ABA ilave edilmiştir. Bu uygulama sayesinde kalluslarda kararma ve hücre zararlanmaları yaşanmamıştır.

Çalışma sonuçları değerlendirildiğinde, anterlerden izole edilen mikrospordan gelişen embriyogenik kallusların oluşumunda ve olgunlaşmasında oksin veya sitokinin türevlerinin çok etkili olduğu tespit edilmiştir. Embriyonik kallus geliştirme ortamlarında oksin hormon miktarı arttırıldığında kallusun renk yoğunluğunun ve

kompakt yapısının geliştiği belirlenmiştir. Çalışmada tarla ve sera koşullarında yetişen materyallerden alınan tomurcuklardan gelişen embriyonik kallus 2.68 adet ile hormon kombinasyonu 10 mg/L 2,4 D + 0,10 mg/L TDZ + 15 mg/L AgNO<sub>3</sub> içeren EDM 2 ortamında fazla sayıda elde edilmiştir. Abdollahi vd. (2018) yapmış oldukları çalışmada benzer olarak en fazla embriyonik kallus sayısını 10 mg/ L 2,4-D + 15 mg/L AgNO<sub>3</sub> içeren ortamda belirlemiştir. Bir başka çalışmada ise 2,4-D'nin nohutta anter kültüründe embriyo oluşumunu ve olgunlaşmasını teşvik ettiği saptanmıştır (Panchangam 2014). 2,4-D ve AgNO<sub>3</sub> birlikte kullanımının embriyonik kallus oluşumuna olumlu etki ettiğini ifade edilmiştir. Bu çalışmalar bizim bulgularımızla paralellik göstermektedir.

Embriyo olgunlaştırma ortamı (EMM) embriyoları olgunlaştırarak çimlenmeye teşvik etmek amacıyla oluşturulmuştur (Grewal vd. 2009). Bu amaçla embriyo olgunlaşmasına yardımcı olacağı düşünülen farklı oksin hormonları belirlenmiştir. Çalışmada oksin hormonu olarak 6 mg/L konsantrasyonunda 2,4-D (EMM 2), 4 mg/L Dicamba (EMM3), 4 mg/L IAA (EMM4) kullanılmıştır. Sonuçta tarla ve sera materyallerinden alınan tomurcuklardan gelişen tüm ortamlar ve genotipler üzerinde en fazla olgunlaşmış embriyonik kallus 2.54 adet ile hormon kombinasyonu 6,00 mg/ L 2,4-D + 0,50 mg/L BAP içeren katı MS ortamı üzerinde kültüre alınan EMM 2 ortamında gözlenmiştir. Abdollahi vd. (2018), çalışmalarında 6 mg/L 2,4-D konsantrasyonu kullanılmıştır. Huda vd. (2003) ise 3 mg / L 2,4-D hormonunun embriyonik kallusları olgunlaştırdığını gözlemlemiştir.

Gibberellik asit (GA<sub>3</sub>) sürgün oluşumunu, sürgün boylarının uzamasını, embriyolarda dormansiyi kaldırarak çimlenme ve sürmeyi uyardığı bilinmektedir. Embriyonik kallus geliştirme ortamlarında (EDM) gelişen kallusları çimlenmeye teşvik etmek amacıyla embriyonik kallus olgunlaştırma ortamlarına Grewal vd.(2009)'nin belirttiği gibi, 5 mg/L GA<sub>3</sub> kullanılmıştır.

EDM ve EMM ortamlarında gelişen, olgunlaşan globüler, kalp, torpedo ve kotiledon evreleri saptanmış embriyoları çimlendirmek ve sürgün rejenerasyonuna teşvik etmek amacıyla Grewal vd. (2009) tarif ettiği şekilde; farklı konsantrasyon ve

kombinasyonlarda oksin/sitokininin tipleri içeren modifiye rejenerasyon ortamlarına (PRM) aktarılmıştır. Tarladan alınan materyallerden elde edilen bütün uygulamalar arasında en fazla sürgün 2.11 adet ile hormon kombinasyonu 1,00 mg/L BAP + 0,03 mg/L NAA içeren PRM 3 ortamında sağlanmıştır. Benzer şekilde, Grewal vd. (2009)'nin yaptıkları çalışmada, ortamda BAP + NAA hormonu birlikte bulunduğu yüksek oranda kallustan sürgün oluşumu gözlenmiştir. BAP ve NAA birlikte kullanıldığı zaman oldukça sağlıklı, uzun ve morfolojik olarak normal görünüme sahip sürgünler elde edilmistir. Çeşitli konsantrasyonlardaki BAP/TDZ birlikte kullanıldığında uzun ve sağlıklı sürgünler elde edilmesine rağmen bu sürgünlerin BAP ve NAA kombinasyonuna göre morfolojik olarak daha zayıf olduğu gözlenmiştir. Bu da ortama eklenen NAA'nın uzun ve sağlıklı sürgünler oluşturmak için daha etkili olduğunu göstermektedir.

Embriyonik kallus geliştirme ve olgunlaştırma ortamları 22 °C'de karanlık koşullarda inkübe edilmiştir. Embriyo oluşturma ve geliştirme ortamları yüksek miktarlarda oksin hormonu içermesi ve oksinlerin karanlıkta aktive olması sebebiyle karanlık ortamda tutulmuştur. Rejenerasyon ortamları yüksek miktarda sitokininin içermesi ve sitokininin ışıkta aktive olması nedeniyle 16 saat ışık fotoperiyodunda (50  $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ) %70 nemin bulunduğu iklim dolaplarında 24 °C'de tutulmuştur. Karanlık ortamda bekleyen eksplantlar direkt ışığa maruz bırakılmadan aliminyum folyo ile petrilerin üzerleri 1 hafta süresince kapatılarak kademeli bir şekilde ışıklı ortama adapte olmaları sağlanmaya çalışılmıştır.

Nohutun *in vitro* koşullarında gelişimini sınırlandıran en büyük engellerden biri güçlü kök sisteminin indüksiyonunu ve gelişmesini sağlayabilmektedir. Köklendirme ortamında kullanılan makro ve mikro elementlerin konsantrasyonlarındaki azalmalar ile farklı oksin hormonları kullanılarak köklenme meydana gelebilmektedir (Anwar vd. 2010). Polisetty vd. (1996) anterden gelişen sürgünleri 30 gün boyunca büyüme düzenleyici kullanmaksızın MS besin ortamlarına aktarmışlar ve sürgünlerde köklenmeler gözlenmiştir. Yapılan başka bir çalışmada ise Huda vd. (2003) rejenere olan sürgünlerde kültüre alındıktan 8 hafta sonra 1 mg/L IBA içeren ½ MS besin

ortamında kök gelişimi gözlenmiştir. Birçok çalışmada nohutta, köklendirme aşamasının oldukça güç olduğu rapor edilmiştir (Singh vd. 2002, Sanyal 2005, Anwar vd. 2010). Bu çalışmada ise, rejenere olan sürgünler oksin içermeyen ve 0,25, 0,50 mg /L IAA, 0,25, 0,50 mg /L NAA, 0,25, 0,50 mg/L IBA içeren ½ MS besin ortamları üzerine köklenme ortamlarına aktarılmıştır. Fakat besin ortamlarının hiçbirinde sürgünlerde köklenme gözlenmemiştir. Singh vd. (2002) çalışmalarında nohutta *in vitro* koşullarda elde edilen somatik embriyolardan gelişen sürgünlerde kök oluşumunun çok zayıf olduğu bu nedenle tam gelişkin bitkiye dönüşüm hızının düşük olduğunu vurgulamıştır. *In vitro* koşullarında gelişen nohutların aklimatizasyonu ve sera veya tarla koşullarında hayatta kalma şansının az olduğunu belirtmişlerdir. Başka bir çalışmada ise, bitkiciklerin *in vivo* koşullarda %60 - 80'inin hayatta kalabildiği ortaya konmuştur (Polysetty vd. 1997).

Bitkilerin ploidi seviyelerini belirlerken birçok yöntem kullanılmaktadır. Bunlardan en sık kullanılan yöntemler arasında flow sitometri yöntemi ve kök ucu hücrelerden kromozom sayımı gelmektedir. Eshaghi vd. (2015) tarafından tarif edilen protokole göre, kök ucu hücrelerinin kromozom sayısına bakılarak bitkilerin ploidi düzeyleri belirlenmiştir. Grewal vd. (2009) yaptıkları çalışmada ploidi seviyelerini rejenere olan embriyonik kalluslarda ve bitkiciklerde ploidi cihazı ve kromozom sayımı ile belirlemiştir. Bu çalışmada ise sürgünlerin ploidi düzeyleri ploidy analizi (sysmex cyflow ploidy analyser) cihazı kullanılarak tespit edilmiştir. Elde edilen bitkiciklerin %50'sinin diploid seviyede olduğu spontan katlanma olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda nohutta spontan katlanmaların sıkça görüldüğü rapor edilmiştir (Eshaghi vd. 2015, Abdollahi vd. 2018). Elde edilen bitkiciklerde spontan katlanma görüldüğünden herhangi bir kimyasal uygulamasına gerek görülmemiştir.

## 6. SONUÇ

Bu tez çalışmasında antraknoza dayanıklı nohut çeşitleri geliştirmek amacı ile yürütülen ıslah programında farklı genotipler kullanılarak yapılan melezlemelerden elde edilen F<sub>2</sub> kademesindeki 11 farklı popülasyon ve 4 nohut çeşidi, anter kültürü çalışmalarında donör bitki olarak kullanılmıştır. Bu çalışmada tarla ve sera koşullarında yetiştirilen bitkilerde farklı sürelerde ön soğuk uygulamaları (+ 4 °C de 0, 4, 7 gün), farklı kallus teşvik ortamları ve çeşitli oksin ve sitokinin kombinasyonlarını içeren sürgün teşvik ortamları kullanılarak yüksek frekansta haploid bitkicikler elde edilmeye çalışılmıştır.

Bu çalışmada, farklı çevre koşullarında yetişen donör bitkilere ait mikrosporların anter kültürüne tepkilerinin araştırılması amacıyla, denemeler arazi ve sera koşullarında yürütülmüştür. Araştırma bulgularına göre; tarla koşullarında yetişen donör bitkilerinde kallus ve sürgün oluşum oranı kontrollü (sera) koşullarda yetişenlere göre daha fazla bulunmuştur. Serada yetiştirilen donör bitkilere ait anterlerde, EDM ortamlarının tümünde, daha az sayıda embriyonik kallus elde edilmiş ve hiçbir şekilde sürgün rejenerasyonu sağlanamamıştır.

Anterleri tek çekirdekli mikrospor safhasında olan, antesis devresine girmemiş 2 numaralı gelişme döneminde olan tomurcuklar, androgenesiste en iyi sonucu vermiştir.

Hem tarla hem de sera koşullarındaki donör bitkilerden alınan tomurcuklar 4 °C'de 4 gün karanlıkta bekletildiğinde embriyo geliştirme ve olgunlaştırma ortamlarında daha fazla sayıda kallus ve embriyo oluşumu gözlenmiştir. Buna bağlı olarak sürgün oluşum frekanslarının pozitif etkilendiği düşünülmektedir.

Embriyonik kallus geliştirme (EDM) ve olgunlaştırma (EMM) ortamlarında 22 °C'de karanlık inkübe edilmiştir. Sürgün rejenerasyonu 16 saat ışık fotoperiyodunda (50  $\text{minimol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ) %70 nem oranına sahip iklim dolaplarında  $24 \pm \text{°C}$ 'de sağlanmıştır.

Çalışmada tarla ve sera koşullarında yetişen donör bitkilerden alınan tomurcuklardan gelişen embriyonik kallus sayısı en fazla EDM 2 ortamında (10 mg /L 2,4-D + 0,10 mg/L TDZ+ 15 mg/L AgNO<sub>3</sub>) olan sağlanmıştır.

Embriyo olgunlaştırma ortamı (EMM) embriyoları olgunlaştırarak çimlenmeye teşvik etmek amacıyla oluşturulmuştur. Tarla ve sera materyallerinden alınan tomurcuklardan gelişen tüm ortamlar ve genotipler üzerinde en fazla olgunlaşmış embriyonik kallus oluşumu EMM 2 ortamında gözlenmiştir.

Anter kültüründe etkili bir netice almak için genotipe göre değişen besin ortamlarının belirlenmesi gerekmektedir. Çalışmadan elde edilen bulgura göre; tarla ve sera koşullarında yetişen materyaller arasında, tüm uygulamalarda, embriyonik kallus geliştirme ortamlarında en fazla embriyonik kallus sayısı F<sub>2</sub> kademesindeki 8. popülasyonunda izlenmiştir. Bununla birlikte en fazla olgunlaşmış embriyonik kallus sayısı F<sub>2</sub> kademesindeki 1. popülasyonunda elde edilmiştir.

Tarla ve sera koşullarında yetişen materyallerden alınan anterlerden gelişen embriyonik kalluslardan en fazla sürgün oluşumu, bütün uygulamalar arasında, F<sub>2</sub> kademesindeki 1. popülasyonda elde edilmiştir. En az sürgün sayısı Gökçe, Uzunlu 99, Er 99 ve Dikbaş çeşitlerinde görülmüştür.

Denemede kullanılan F<sub>2</sub> kademesindeki 11 adet popülasyon, tüm uygulamalarda, daha yüksek frekansta kallus, embriyonik kallus ve sürgün oluşturma kapasitesine sahip bulunmuştur. Buna rağmen denemede kullanılan çeşitlerin tüm uygulamalarda, kallus ve sürgün oluşturma gücü düşük bulunmuştur.

Nohutta anter kültürü tekniği çalışmalarında, anterlerden embriyonik kallus gelişimi ve sürgün rejenerasyonu oluşumu uzun zaman almaktadır. Ayrıca nohut gibi inatçı türler, rejenerasyon kabiliyeti zayıf ve dış uygulamalara daha geç tepki verdiği için, her aşaması ayrı çalışma gerektirmektedir.

Çalışma sonucunda anterlerden gelişen embriyonik kalluslardan sürgün rejenerasyonları elde edilmiş, elde edilen sürgünlerin ploidi düzeyleri belirlenmiş, farklı oksin tipi ve konsantrasyonlarını içeren besin ortamlarındaki köklendirme çalışmaları devam etmektedir.



## 6. ÖNERİLER

Anter kültürü tekniği ile nohutta haploid bitkinin elde edilmesinde genotip etkisi, tomurcuklara uygulanan ön işlemler, besin ortamlarının içeriği, inkübasyon ve donör bitkinin yetiştirilme koşulları gibi çok sayıda etken bulunmaktadır. Androgenesis başarısında, tüm bu etkenlerin birbiri ile ilişkili olduğu düşünüldüğünde, baklagillerde anter kültürü tekniğinin etkili bir şekilde uygulandığı, yayınlanmış ve faydalanılabilir protokoller bulunmamaktadır. Bununla birlikte; ülkemizde şu ana kadar nohutta anter kültürü tekniğinden yararlanılarak, indüksiyon ve kallus oluşum aşamasından ileriye gidilememiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar ile anter kültürü tekniği ile double haploid nohut eldesi üzerine büyük ilerleme kaydedilmiştir.

Nohut farklı konsantrasyonlarda uygulanan büyüme düzenleyicilere farklı cevaplar vermektedir. Buna göre; çoklu sürgünlerin indüksiyonu ve rejenerasyonu için daha düşük konsantrasyonda ve daha az sayıda hormon uygulanarak, daha sağlıklı sonuçlar elde edilmiştir.

Rejenerasyonun gerçekleşebilmesi için, bitki büyüme hormonlarının uygun konsantrasyonlarının yanında, inkübasyon süresinin de önemli etkisi olduğu tespit edilmiştir. İnkübasyondan sonra hemen ışıklı ortama aktarmak yerine, kademeli olarak, direk ışığa almamak koşulunda sürgün oluşumları meydana geleceği söylenebilir.

Nohutun *in vitro* başarısını sınırlandıran iki temel unsur indüksiyon ve güçlü kök sisteminin geliştirilerek dış koşullara aktarılmasıdır. Nohutta rejenerasyon protokolleri tekrar edilebilir şekilde yaygın olmamakla birlikte rejenere olanların kök uyarımı ve bitkiciklerin aklimatizasyonu da dış çevrede başarılı değildir. Köklenme; sürgünler kırılğan değil sert olduğunda veya başka bir deyişle kallus oluşturma eğiliminde olmadığında gerçekleşmektedir.

Nohutta kallus, embriyo ve sürgün oluşum aşamalarının optimizasyonu genotipe göre değişmekle birlikte uzun zaman almaktadır. Buna göre; melezleme aşamasında hedefe yönelik bir kombinasyon oluşturulduğu takdirde, ortaya çıkan az sayıda popülasyon için ayrı ayrı double haploid bitki elde etme protokolleri geliştirilmelidir. Embriyogenesis ve rejenerasyon koşullarının genotipe göre geliştirilmesi için nohutta anter kültürü tekniği çalışmalarının devamlılığı sağlanmalıdır. Ayrıca, bu teknikten yararlanılarak kısa zamanda elde edilecek homozigot hatların, ıslahçı ve tohumculuk üreticilerine büyük katkılar sağlayacağı öngörülmektedir.



## KAYNAKLAR

- Abdollahi MR, Rashidi S. 2018. Production And Conversion of Haploid Embryos in Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Anther Cultures Using High 2,4-D and Silver Nitrate Containin Media. Plant Cell Tiss Organ Cult. 133(1):39-49.
- Acikgoz, N., Ashraf, M., M., ve Moghaddam, A., F. 1994. Bitki Genetik Kaynakları Nohut Popülasyonlarının Bazı Morfolojik Özellikler Açısından Sınıflandırılması. Tarla Bitkileri Kongresi, Ege Üniv. Zir. Fak. Ofset Basımevi, 130-133.Bornova/İzmir.
- Altaf N,Ahmad MS. 1986. Plant regeneration and propagation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) through tissue culture techniques.pp 407–417. IAEA, Vienna.
- Antındal,N. 2005. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Çavdarda (*Secale Cereale* L.) Anter Kültüründe Ploidi, Ön İşlem Ve Besin Ortamı İçeriğinin Etkisi. Yüksek Lisans Tezi Tarla Bitkileri Ana Bilim Dalı - 14s. Isparta.
- Anonim. 2018. Türkiye İstatistik Kurumu Tahıllar ve Diğer Bitkisel Ürünlerin Alan ve Üretim Miktarları İstatistikleri Raporu. Erişim Tarihi: 20.04.2020.
- Anonymous 2018. Food and Agriculture Organization of the United Nations 2017. faostat.fao.org. Erişim Tarihi: 20.04.2020.
- Anonim.2018a. Tarımsal Araştırmalar Politikalar Genel Müdürlüğü Yemelik Tane Baklagiller Çalıştay Bildiri Raporu, 206s. Mersin.
- Anonim. 2018b. Toprak Mahsülleri Ofisi Genel Müdürlüğü Bakliyat Sektör Raporu, 2s., Ankara.
- Anonim. 2019. Türkiye İstatistik Kurumu Tahıllar ve Diğer Bitkisel Ürünlerin Alan ve Üretim Miktarları İstatistikleri Raporu. Erişim Tarihi: 20.04.2020.
- Anonim. 2019a. Bitkisel Üretim Genel Müdürlüğü Ürün Masaları Nohut Bülteni, 1s., Ankara.
- Anonim. 2019b. Bitkisel Üretim Genel Müdürlüğü Ürün Masaları Nohut Bülteni, 2s., Ankara.
- Anonim. 2019c. Bitkisel Üretim Genel Müdürlüğü Ürün Masaları Nohut Bülteni, 3s., Ankara.
- Anonim. 2019d. Bitkisel Üretim Genel Müdürlüğü Ürün Masaları Nohut Bülteni, 7s. Ankara.
- Anwar F., Sharmila P. and Saradhi Pardha P. 2010. No more recalcitrant chickpea regeneration and genetic transformation. Department of environmental biology, University of Delhi, India.
- Arı, E., 2006. Türkiye’de Doğal Olarak Yetişen Anemone coronaria var. coccinea’da anter kültürü çalışmaları. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı Doktora Tezi, 180, Adana.
- Aykroyd, W. R., Doughty, J., Walker, A. 1982. Legumes in human nutrition; food and agriculture organization, Rome.

- Batra P., et. al., 2002. Efficient protocol for *in vitro* direct plant regeneration of chickpea (*Cicer arietinum* L.). J. Exp. Biol. 40(5):600-602. India.
- Bajaj, Y. P. S. 1983."In Vitro Production Of Haploids." Handbook Of Plant Cell Culture.USA.
- Blakeslee, A.F., Belling, J., Farnham, M.E. and Bergner, A.D. 1922. A haploid mutant in the weed, "Datura stramonium". Science. 55(1433): 646-7.
- Barna, K. S. and Wakhlu, A.K. 1994. Whole plant regeneration of *Cicer arietinum* from callus cultures via organogenesis, Plant Cell., 13:510-513.
- Croser, J.S. 2009."Haploid And Zygotic Embryogenesis In Chickpea (*Cicer Arietinum* L.)." Phd, The University Of Melbourne, Melbourne, Australia.
- Çagırgan, M.I., Toker, C., 2001. Kışlık Yetiştirmeye Uygun Nohut (*Cicer arietinum* L.) Islahı Soğuğa Tolerans ve Antraknoza Dayanıklılık. IV. Tarla Bitkileri Kongresi, Tahıllar ve Yemelik Tane Baklagiller Cilt 1, 339-344. Tekirdağ.
- Çelik Özer. G., Karaoğlu.C., Aydoğan.A. ve Kılınç.V.H. 2019. Mercimekte Hızlı Islah Teknikleri Kullanılarak Generasyon Süresinin Kısaltılması. Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Dergisi, 28(2):103-111.
- Chen, Y., 1988. In Vitro Development of Plant from Microspores of Rice. In: Hu, H. and Chen, Y. Editors, Plant Somatic Genetic Genetics and Crop Improvement. Beijing University Press. pp. 27-67 Beijing.
- Cho, M.S., Zapata, F.J., 1990. Plant Regeneration from Isolated Microspores of Indica Rice. Plant Cell Physiol. 31: 881-885.
- Çiftçi C.Y. Ve Adak M.S. 2009. Yemelik Tane Baklagiller. Tarla Bitkileri. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları. Yayın No: 1569. Ders Kitabı: 521. Sayfa 257-308.
- Cistue, L., Ramos, A., Castillo, A.M., and Romagosa, I., 1994. Production of large number of doubled haploid plants from barley anthers pretreated with high concentrations of mannitol. Plant Cell Report, 13: 709-712.
- Dolar, F.S. and A. Gürcan. 1992. Pathogenic variability and race appearance of *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. in Turkey. Journal of Turkish Phytopathology, 21: 61-65.
- Dodds, J.H., Roberts, L.W., 1985. Experiments In Plant Tissue Culture. Cambridge University Press, New York.
- Ellialtıoğlu, Ş., Sari, N. ve Abak, K. 2001. Haploid Bitki Üretimi, Bitki Biyoteknolojisi-I Doku Kültürü ve Uygulamaları.137-189. Konya.
- ER, C., 1992. Bitki Islahında Doku Kültürleri. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Yayını, 83s. Ankara.
- Ferrie, A. and Keller, W.A., 1997. Production of Haploids in Brassica Spp. Via Microspor Culture. Plant Tissue Culture Manuel, 1- 17. The Netherlands.

- Grewal,R.K., Monika, L., Croser, J.And Ochott, S. 2009. Doubled Haploid Production In Chickpea Role Of Stress Treatments. Plant Cell Reports (28):1289-1299.
- Guha S, Maheshwari SC.1964. *In vitro* production of embryos from anthers of Datura. Nature 204: 497.
- Güleryüz M, 198. Bahçe ziraatinde büyütücü ve engelleyici maddelerin kullanılması ve önemi, Atatürk Üniversitesi Yayınları, No: 2.
- Gürel, A., Tosun, M., Demir, İ., 1992. Arpa Islahında Haploidi Teknikleri Ve Anter Kültürünün Önemi. Arpa-Malt Semineri. 312-326 s. Konya.
- Gürlek, D., 2006. Agrobacterium Tumefaciens Aracılığıyla Nohut Geveni (Astragalus Cicer L.)'Ne Gen Aktarımı. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Ana Bilim Dalı,35,Ankara.
- Hatipoğlu, R., 1999. Bitki Biyoteknolojisi. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi 190, Ders Kitapları Yayın A-58, 178 s, Adana.
- Haware, M.P., 1987. Occurrence of Perfect Stage of Ascochyta rabiei in Syria. International Chickpea 17:29-30.
- Huda,S and et all. 2003.Shoot Differentiation From Cotyledon Derived Callus Of Chickpea (Cicer arietinum L.) Plant Tissue Cult. 13:1, 53-59.
- Horner, M, and Street, E.,1978. Pollen Dimorphism-origin and significance in pollen plant formation by anther culture. Annual Botany, 42: 763-777.
- Johansson, L., 1983. Effects of Activated Charcoal in Anther Cultures. Physiologia Plantarum. 59: 3, 397-403.
- Kaiser, W.J., 1973. "Factors affecting growth, sporulation, pathogenicity, and survival of Ascochyta rabiei", Mycologia, 65, 444-457.
- Kantar, F., Et Al. 2007. "Chickpea: Rhizobium Management And Nitrogen Fixation." *Chickpea Breeding And Management* 179.
- Keller, W.A, Arnison, P.G, Cardy, B.J. 1987a. Haploids from gametophytic cells - recent developments and future prospects. Plant tissue and cell culture, Int. Plant Tissue Culture Congr.,New York.
- Keller WA, Fan Z, Pechan P, Long N, Grainger J. 1987b. An efficient method for culture of isolated microspores of Brassica napus. Proc 7th Int Rapeseed Congr., Poland, May 11-14, 1987, Keller, Canada, Fax: 306-975-4839, pp 152 - 157.
- Khan, S.K. and Ghosh,P.D. 1983. *In vitro* induction of androgenesis and organogenesis in *Cicer arietinum* L. Current Science 52,891-893.
- Kumlay AM, Eryiğit T. 2011. Bitkilerde Büyüme ve Gelişmeyi Düzenleyici Maddeler: Bitki Hormonları. Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 1(2): 47-56.

- Kumar V.D. , Kirti P.B., Sachann J.K.S., Chopra V.L. 1994. Plant regeneration via somatic embryogenesis in chickpea. *Plant Cell* . 13: 468-472.
- Khush, G.S. and Virmani, S.S. 1996. Haploids in plant breeding. In: Jain SM, Sopory SK, Veilleux RE (eds) *In Vitro* Haploid Production in Higher Plants, Dordrecht: Kluwer, Vol. 1, pp. 11–33.
- Küsmenoglu, I., 1990. Ascochyta blight of chickpea: Inheritance and relationship to seed size, morphological traits and isozyme variation. Washington State University Department of Agronomy and soils. A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in Agronomy, 81 p. USA.
- Kim, M., Kim, J., Yoon, M., Choi, D-Ii., And Lee, K-M., 2004. Origin Of Multicellular Pollen And Pollen Embryos In Cultured Anthers Of Pepper (*Capsicum Annum*). *Plant Cell, Tissue And Organ Culture*, 77: 63-72.
- Mahajan, S. Ve Tuteja, N., 2005. Cold, Salinity And Drought Stresses: An Overview, *Archives Of Biochemistry And Biophysics*, 444, 139-158.
- Mityko, Judit, Et Al. 1995: "Anther- culture response in different genotypes and f1 hybrids of pepper (*capsicum annum* l.)." *plant breeding* 114.1 78-80.
- Murthy et all., 1996. In vitro regeneration of chickpea (*Cicer arietinum* L.) Stimulation of direct organogenesis and somatic embryogenesis by thidiazuron. *Plant. Growth. Regul.* 19(3) 233-240.
- Nene, Y.L., Reddy, M.V., 1987. "Chickpea diseases and their control. In: Saxena, M.C., Singh, K.B. (eds.)", *The Chickpea*, CAB International, 99- 125. Wallingford, Oxon.
- Panchangam,S.S.,Mallikarjuna ,N.,Gaur,P.M And Suravajhala,P. 2014. Androgenesis In Chickpea. Anther Culture And Expressed Sequence Tags Derived Annotation.*Indian Journal Of Experimental Bology*.52(12) Pp.181-188.
- Pelletier, G. And Henry, Y. 1974. Cold Pretreating Flower Buds Of *Nicotiana Tabacum* L. *Haploid Information Service* 10, 5-8.
- Poehlman, M. J., 1959. *Breeding Field Crops*. Holt Rine Hart And Winston, Inc., New York.
- Polysetty R. 1997. Multiple shoot induction by benzyladenine and complete plant regeneration from seed explants of chickpea. *Plant Cell* , 16: 565-571.
- Polisety R., Patill P. 1996. Rooting and establishment of *in vitro* shoot explants of chickpea. *Ind. Biology* 34: 806-809.
- Prakash S. , Chowdhary J.B., Jain R.K., Chowdhary V.K. 1992 . Factors affecting plant regeneration in chickpea . *Ind. J. Biology*. 30 : 1149 - 1153.
- Raghavan, V. 1978. Origin and Development of Pollen Embryoids and Pollen Calluses in Cultured Anther Segments of *Hyoscyamus niger*. *Amer. J. of Botany*, 65 (9): 984-1002.
- Rajhathy T.1976. Haploid flax revisited. *Z Pflanzenzuecht* 76: 1–10.

- Rey, H.Y., Sansberro, P.A., Collavino, M.M., Davina, J.R., Gonzales, A.M., and Mroginski, L.A., 2002. Colchicine, Trifluralin and Oryzalin Promoted Development Of Somatic Embryos In *Ilex Paraguariensis*. 123: 49-56. *Euphytica*.
- Reynolds, T.L., 1984. An Ultrastructural and Stereological Analysis of Pollen Grains of *Hyoscyamus niger* During Normal Ontogeny and Induced Embryogenic Development. *American Journal of Botany*. 7(4):490-504.
- Sangwan, R. S., And H. Camefort. 1978 . "Action D'un Choc Thermique Sur Le Contenu En Acides Amines Des Antheres Et Des Grains De Pollen Embryogenes Du *Datura Metel* L. Et Du *Nicotiana Tabacum* L." *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances. Serie D. Sciences Naturelles*.
- Salunkhe, C.K., Rao, P.S., Mhatre, M., 1999. Plantlet Regeneration Via Somatic Embryogenesis In Anther Callus Of *Vitis Latifolia* L. *Plant Cell Rep.*, 18, 670- 673.
- Sanyal I, Singh A.K., Kaushik M., Amla D.V. 2005. Agrobacterium mediated transformation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) with *Bacillus thuringiensis cry1Ac* gene for resistance against pod borer insect *Helicoverpa armigera*. *Plant Sci*. 168: 1135-1146.
- Sajja S.B. , Samineni S. and Gaur P.M. 2017. Botany of chickpea. In the chickpea genome Springer, (13- 24), Cham.
- 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 Residual Effects of Legumes in Rice and wheat Cropping Systems of the Indo-Gangetic Plain; Kumar Rao, J.V.D.K., Johansen, C., Rego, T.J., Eds.; Oxford and IBH Publishing Co. Pvt. Ltd: New Delhi,; pp. 14–30. India.
- Sari, N., Abak, K., Pitrat, M., Rode, J.C., And Dumas De Vault, R., 1994. Induction Of Parthenogenetic Haploid Embryos After Pollination By Irradiated Pollen In Watermelon. *Hortscience*, 29 (10): 1189-1190.
- Singh K.B., Singh O., Sethi S.C., Gowda C.L.L. and Kumar J. 1976. International crops research institute for the semi -arid tropics ( ICRISAT ). Report. (7): 4, India.
- Singh, K. B., And Malthotra, R. S. And Witcombe, J. R. 1983. Kabuli Chickpea Germplasm Catalog. Icarda, Aleppo, Syria.
- Singh, K. B. and Reddy, M. V. 1993. Resistance to six races of *Ascochyta rabiei* in the world germplasm collection of chickpea. *Crop Science*, 33 (1-2); 186-189.
- Singh, R., et.al., 2002. High frequency multiple shoot regeneration from decapitated vembriyo axes of chickpea and establishment of plantlets in the open environment. *Biol. Plant*. 45(4):503-508.
- Smykal, P., 2000. Pollen Embryogenesis – The Stress Mediated Switch From Gametophytic To Sporophytic Development. Current Status And Future Prospects. *Biologia Plantarum*, 43 (4): 481-489.

- Smykal, P., CJ Coyne, MJ Ambrose, N Maxted, H Schaefer, MW Blair, Jens Berger, Stephanie L. Greene, Matthew N. Nelson, Naghmeh Besharat, Tomáš Vymyslický, Cengiz Toker, Rachit K. Saxena, Manish Roorkiwal, Manish K. Pandey, Jinguo Hu, Ying H. Li, Li X. Wang, Yong Guo, Li J. Qiu, Robert J. Redden & Rajeev K. Varshney . 2015. Legume crops phylogeny and genetic diversity for science and breeding. *Critical Reviews in Plant Sciences* 34 (1-3), 43-104.
- Szakacs E, Kovacs G, Pank J, Barnabus B. 1988. Substitution Analysis Of Callus Induction And Plant Regeneration From Anther Culture In Wheat (*Triticum Aestivum* L.). *Plant Cell Rep* 7:127–129.
- Sehirali, S. 1988. *Yemeklik Tane Baklagiller Ders Kitabı*. Ankara Üniversitesi Zir. Fak. Yayınları, No:224.
- Sunderland, N., And Dunwell, J.M., 1977. *Anther And Pollen Culture* (H.E. Street Editor). Botanical Monographs, Volume:11: Plant Tissue And Cell Culture, Second Edition. Blackwell Scientific Publications, Oxford. P: 223-266.
- Swanson EB, Coumans MP, Brown GL, Patel JD, Beversdorf WD. 1988. The characterization of herbicide-tolerant plants in *Brassica napus* L. after *in vitro* selection of microspores and protoplasts. *Plant Cell Rep* 7: 83–87.
- Swanson EB, Erickson LR .1989. Haploid transformation in *Brassica napus* using an octopine-producing strain of *Agrobacterium tumefaciens*. *Theor Appl Genet* 78: 831–835.
- Toker, C., B. Uzun, F.O. Ceylan, and C. Ikten, 2014. Chickpea. In: *Alien Gene Transfer in Crop Plants*, A. Pratap and J. Kumar Eds., Volume 2, Springer, Dordrecht, pp: 121-151.
- Touraev, A., Vicente, O., And Heberle-Bors, E., 1997. Initiation Of Microspor Embryogenesis By Stress. *Trends In Plant Science* Vol:2 (8): 297- 302.
- Türkkan M, Dolar FS. 2009. Determination of pathogenic variability of *Didymella rabiei*, the agent of ascochyta blight of chickpea in Turkey. *Turkish J. Agric. For.*, 33: 585-591.
- Vasil, I.K., 1980. Androgenetic Haploids. In: *Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture Supplement*, 11A Int. Review of Cytology, Academic Press, New York. pp.195-213.
- Van Der Maesen, L. J. G., Et Al. 2007. "Taxonomy Of The Genus *Cicer* Revisited." *Chickpea Breeding And Management*. *Cab International, Wallingford* : 14-46.
- Vavilov, N.I. 1951. *Phytogeographic Basis Of Plant Breeding. The Origin, Variation, Immunity And breeding of Cultivated Plants*. *Chronica Botanica* 13, 1–336.
- Vessal, S.R. Bagheri, A. and Safarnejad, A. 2002. The possibility of *in vitro* haploid production in chickpea. *Journal of science and technology of agriculture and natural resources* 6, 67-76.
- Wood J.A. And Grusak M.A. 2007. Nutritional Value of Chickpea. *Chickpea Breeding and Management* (Ed. S.S. Yadav). *Cab International*, Chapter 5.

Wilson, H.M., Mix, G. And Foroughi-Wehr, B., 1978. Early microspore division and subsequent formation of microspore calluses at high frequency in anthers of *Hordeum vulgare* L., *J. Exp. Bot.*, 29: 227-238.

Zamir, D., Jones, R.A., And Kedar, N., 1980. Anther Culture Of Male-Sterile Tomato (*Lycopersicon Esculentum* Mill.) Mutants. *Plant Science Letters* 17: 353-361.



## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Gözde ÇELİK ÖZER

Doğum Yeri: Karadeniz Ereğli

Doğum Tarihi: 22/05/1986

Medeni Hali: Evli

Yabancı Dili: İngilizce

### **Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)**

Lise : Karadeniz Ereğli Anadolu Lisesi (2004)

Lisans : Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri A.B.D (2008)

Yüksek Lisans: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri A.B.D (Eylül 2008 - Ağustos 2010)

### **Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl**

- Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Yemelik Tane Baklagil Islah Birimi, Ziraat Yüksek Mühendisi (2011-2017)
- Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (TAGEM), Tarla Bitkileri Araştırmaları Daire Başkanlığı, Endüstri Bitkileri ve Yemelik Tane Baklagiller Araştırmaları Koordinatörü (2017 – 2019)
- Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü, Biyoteknoloji Araştırma Merkezi (2019- devam )

### Ulusal ve Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler

1. **Çelik, G.** And E.Turhan, (2011) ‘ Genotypic variation in growth and physiological responses of common bean ( phaseolus vulgaris L.) seedlings to flooding’. African J. Biotechnology, Vol: 10 (38): 7372-7380
2. Aydoğan A., Gürbüz A., Akan K., Kon H.İ.F., Mert Z., **Çelik Özer G.**, (2016) ‘Mercimek (Lens Culinaris M.) Germplasmında Herbisit Toleransı İçin Genetik Çeşitliliğin Belirlenmesi’. Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi Özel Sayı-1: 165-170
3. **Çelik Özer G.**, Karaoğlu C., Aydoğan A., Kılınç V.H., (2019) ‘Mercimekte (Lens culinaris M.) Hızlı İslah Teknikleri Kullanılarak Generasyon Süresinin Kısaltılması’. Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi 28 (2): 103-111

### Ulusal ve Uluslararası Kongrelerde Sunulmuş Bildiri ve Posterler

1. Turhan, E., **G.Çelik** , A.Baykul (2011) ‘Bazı taze fasulye genotiplerinin su fazlalığına toleransının belirlenmesi ’. Uluslararası 1. Ali Numan Kıraç Tarım Kongresi Kongre Kitabı . Cilt 1 s: 887-891
2. Kayan N., K. Sönmez., **G.Çelik** ve E.Turhan, (2009) ‘ Bazı bakla (Vicia faba L.) çeşitlerinin fide döneminde tuzluluğa tolerans düzeylerinin belirlenmesi’ Türkiye VII. Tarla Bitkileri Kongresi , Cilt 2 (Poster Bildiriler) s: 707-711
3. **Çelik Özer G.**, Çetin Özkan G., Hajyzadeh M., Khawar K.M., Aydoğan A.,Gürbüz A.,(2015).Nohutta anter kültürü tekniğinin uygulanabilirliğinin araştırılması,18.Bitki Biyoteknolojisi Kongresi (Sözlü bildiriler), Konya.
4. Aydoğan A., Gürbüz A., Gayberi M., **Çelik Özer G.**(2015)Nohut (Cicer arietinum L.) islahında generasyon atlatma tekniğinin Türkiye koşullarında uygulanabilirliğinin araştırması çalışmaları,11.Tarla Bitkileri Kongresi, Poster bildiri.

5. Aydoğan A., Gürbüz A., Akan K., Kon İ.F., **Çelik Özer G.** (2015). Mercimek (*Lens culinaris* M.) germplasmında herbiside toleranslılık için genetik çeşitliliğinin belirlenmesi, 11. Tarla Bitkileri Kongresi, Poster Bildiri. Çanakkale.
6. **Çelik Özer G.**, Çetin Özkan G., Hajyzadeh M., Aydoğan, A. Influence of Different Stress and Concentration Conditions on Double Haploid Planting Process in Chickpea. 2nd International Balkan Agriculture Congress. Namık Kemal Üniversitesi, Tekirdağ. 16-18 Mayıs 2017. Poster Bildiri.
7. Koyuncu N., Çalışkan M., Çetin Özkan G., Çetinkaya S., Karaoğlu C., Özcan S.F., **Çelik Özer G.**, Ertekin Öner F. Micropropagation of turkish hazelnut cultivar "Palaz". 2nd International Balkan Agriculture Congress. Namık Kemal Üniversitesi, Tekirdağ. 16-18 Mayıs 2017.
8. **Çelik Özer G.**, Çetin Özkan G., Aydoğan A. Haploid plant production study in plants belonging to wild chickpea 'Cicer reticulatum'. INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BIODIVERSITY and Edible Wild Species. Antalya. 3-5 April 2017.
9. Melike Erol-Demirbilek, Canan Yagci-Tuzun, **Gözde Celik-Ozer**, Ilhan Subasi, Burcu Tarikahya-Hacioglu, Yusuf Arslan. "Antibacterial effects of *Carthamus* L. (Asteraceae) species". International Symposium on Biodiversity and Edible Wild Species (BEWS2017), (Poster Sunum), 3-5 Nisan 2017, Antalya, Turkey.
10. **Çelik Özer G.**, Koyuncu Nur\*, Gülden Özkan Çetin, Öner Ertekin Ferah, Özcan Fatih Sancar, Hümeysra Yaman, Tuğçe Uslu, Fatma Gül Vanlıoğlu M., Erdem Şahin S. Effects Of Antibiotic And Fungicide Usage During Sterilization Of Hazelnut Shoots. . IX. International Congress on Hazelnut 15-19 August 2017, Samsun.
11. Gülden Özkan Çetin, Nur Koyuncu, **Gözde Çelik Özer**, Fatih Sancar Özcan, Hümeysra Yaman, Öner Ertekin Ferah, Kübra Ayaz, Elif Koçak Yetilmezler, Selcen Demir Effects Of Antioxidants To Tissue Browning Problems Of Hazelnut Cultures. IX. International Congress on Hazelnut 15-19 August 2017, Samsun.