

**AYÇİÇEĞİ (*Helianthus annuus* L.)'NDE OROBANŞ VE
HERBISITE DAYANIKLI DİHAPLOİT HATLARIN IN VITRO
KOŞULLARDA GELİŞTİRİLMESİ**

Program Kodu: 1001

Proje No: 214O274

Proje Yürütücüsü
Doç. Dr. Yıldız AYDİN

Araştırmacı(lar):

Prof. Dr. Ahu ALTINKUT UNCUOĞLU

Doç. Dr. Filiz VARDAR

Dr. Göksel EVCI

Msc. Mehmet İbrahim YILMAZ

Danışman:

Prof.Dr. Aynur GÜREL

Prof. Dr. Yalçın KAYA

Bursiyer(ler):

Ezgi ÇABUK ŞAHİN

Elif ÇAKMAK

Ecem DOĞAN

Yunus Emre AKTAŞ

Buse DURSUN

NİSAN 2018
İSTANBUL

ÖNSÖZ

Bu projede, ışınlanmış polen ile tozlama (melezleme) sonrası embriyo kültürü çalışmaları ile dihaploid bitkiler elde edilmiştir.

Bu çerçevede, Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü (TTAE) tarafından yürütülen ülkesel ayçiçeği ıslah projesi kapsamında proje öncesinde geliştirilen SU (sulfonurerea) grubu ve IMI (imidazolinon) grubu herbisitler ile orobanş parazit otuna dayanıklılı ana ve restorer hatların tohumları materyal olarak kullanılmıştır.

Projenin birinci yılında; haploid bitkilerin elde edilmesi çalışmaları kapsamında anter ve mikrospor kültürleri için hem bitki yetiştirme odası hem de tarla koşullarında yetiştirilen bitkilerde uygun başlangıç materyali olan çiçek tomurcuklarının (henüz olgunlaşmamış ve içerisinde birinci polen mitozu aşamasına gelmiş tek çekirdekli mikrosporları bulunduran anterleri içeren tomurcuk-kapitulum) seçimi, çiçek tomurcuklarına ön soğuk uygulaması, çiçek tomurcuklarının sterilizasyonu, anter ve mikrosporların besi ortamlarına transferi ile organ rejenerasyonu çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde tarla koşullarında yetiştirilen bitkilerden alınan çiçek tomurcuklarının hem anter (uygun evrede mikrospor içeren yeterli sayıda) hem de mikrospor (yeterli yoğunlukta) kültürü için daha uygun olduğu görülmüştür. Bu kapsamda farklı ön uygulamalar, besin ortamları ve genotiplerin anter kültüründeki etkileri değerlendirildiğinde en iyi rejenerasyon oranlarının 12 gün +35 °C sıcak ön uygulama (%78.1), A4 içerikli besin ortamı (%38.29) ve G4 genotipinde (%71.43) elde edildiği belirlenmiştir.

Projenin ikinci yılında da devam eden anter kültürü ile rejenerasyonu sağlanan örneklerin flow analizlerinde tüm örneklerin diploid olduklarının belirlenmesi ile projemizde B planı olarak yer alan ışınlanmış polenlerle dişi çiçeklerin tozlanması yoluyla haploid bitki elde edilmesi ve uyartım sonucu oluşan haploid embriyoların bitkiye dönüştürülebilmesi için de devamında embriyo kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Projenin üçüncü yılında ışınlanmış polen ile tozlama ile haploid ve dihaploid bitkilerin elde edilmesi çalışmaları kapsamında aynı materyal Nisan ve Mayıs aylarında olmak üzere iki kademeli olarak ekilmiş ve ışınlanmış polen ile melezlemeler materyal üzerinde yapılmıştır. Elde edilen embriyolardan embriyo kültürü yoluyla bitkiler elde edilmiş ve tohumları alınmıştır. Bu şekilde IMI-K2-R-SN-7/15 (750 gray doz uygulanan restorer materyal)'den 2 adet, IMI-K2-R-SN-22/15 (750 gray doz uygulanan restorer materyal)'den 4 adet ve IMI-K2-AD-SN-2/15 (1000 gray doz uygulanan ana-maintanier materyal)'den 2 adet olmak üzere IMI grubu herbisitlere ve orobanşa dayanıklı toplam 8 adet dihaploid bitki ülkemizde tarımı yapılan yerel çeşitlerde ilk defa elde edilmiştir.

Dihaploid Bitkilerin dayanıklılık testleri ile doğrulanması kapsamında orobanşa dayanıklılık testleri ve herbisit fitotoksite testleri gerçekleştirilerek dayanıklı tek bitkiler elde edilmiştir.

Böylelikle, ışınlanmış polen kültürünün başarıyla uygulanması ile proje kapsamında oluşturulan protokol, ayçiçeği ıslahında kullanılabilmesi yönüyle önemli bir adım niteliğinde olmakla birlikte elde edilen genetik açıdan güvenilir (homozigot dayanıklı) yerli ayçiçeği ebeveyn hatları, projeden sonrada gerçekleştirilecek diğer çalışmalar için kullanılabilir niteliktedir ve ülkemiz tarımına kazandırılacaktır.

Bu noktada proje sonunda elde edilen bilgiler (gerek anter ve mikrospor kültürünün optimizasyonu, gerekse ışınlanmış polen kültürü optimizasyonu ile kendilenmiş saf hatların elde edilmesi), çok sayıda ve nitelikli yeni Ar-ge projelerinin üretilmesine neden olacak ve ülkemizde yapılacak benzer çalışmalara öncülük edecek niteliktedir.

Bu proje TÜBİTAK TOVAG 1001 programı tarafından 214O274 numara ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER	SAYFA
ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	iii
TABLO LİSTESİ	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
ÖZET	xv
ABSTRACT	xvii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	4
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	20
3. 1. Bitkilerin Yetiştirilmesi	20
3. 2. Haploid Bitkilerin Elde Edilmesi	23
3. 2.1. Anter Kültürü ile Haploid Bitkilerin Elde Edilmesi	23
3.2.1.1. Kapitulum büyüklüğünün ve mikrospor gelişim aşamasının belirlenmesi	23
3. 2.1.2. Kapitulumların yüzey sterilizasyonu ve anter izolasyonu	27
3. 2.1.3. Anter kültürü başlangıç ortamlarının hazırlanması ve inkübasyonu	28
3.2.2. Mikrospor Kültürü ile Haploid Bitkilerin Elde Edilmesi	33
3.2.3. Polen Işınlama ile Haploid Bitkilerin Elde Edilmesi	40
3.2.3.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi	40
3.2.3.2. Çiçeklerin İzolasyonu	42
3.2.3.3. Emaskülasyon	43
3.2.3.4. Polenlerin Toplanması ve Işınlanması	43
3.2.3.5. Tozlama	45
3.2.3.6. Embriyoların Çıkarılması ve Kültürü	46
3.2.3.6.1. Tohumların Yüzey Sterilizasyonu	46
3.2.3.6.2. Embriyoların Çıkarılması ve Uygun Embriyo Aşamasının Belirlenmesi	46
3.2.3.6.3. Besin Ortamları ve Kültür Koşulları	47
3.2.3.6.4. In Vitro Bitki Gelişmeleri ve Dış Koşullara Alıştırma	48
3.3. Dihaploid Bitkilerin Eldesi	49
3.4. Ploidi Seviyesinin Belirlenmesi	50
3.4.1. Kromozom Analizi	50
3.4.2. Flow Analizi	51
3.5. Dihaploid Bitkilerin Dayanıklılık Testleri ile Doğrulanması	51
4. BULGULAR	52
4.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi	52

4.2.	Haploid Bitki Eldesi	52
4.2.1.	Anter Kültürü ile Haploid Bitkilerin Elde Edilmesi	52
4.2.1.1.	Kapitulum büyüklüğünün ve mikrospor gelişim aşamasının belirlenmesi	52
4.3.	Mikrospor Kültürü ile Haploid Bitkilerin Elde Edilmesi	94
4.4.	Polen İşnlama ile Haploid Bitkilerin Elde Edilmesi	95
4.4.1.	Bitkisel Materyalin Hazırlanması	95
4.4.2.	Besin Ortamları ve Kültür Koşulları (Embriyo Kurtarma)	98
4.4.3.	<i>In Vitro</i> Bitki Gelişmeleri ve Dış Koşullara Alıştırma	103
4.5.	Ploidi Analizleri ve Dihaploid Bitkilerin Elde Edilmesi	106
4.6.	Dihaploit Bitkilerin Dayanıklılık Testleri İle Doğrulanması	110
5.	TARTIŞMA/SONUÇ	113
5.1.	Haploid Bitkilerin Elde Edilmesi	113
5.2.	Dihaploid Bitkilerin Elde Edilmesi	116
5.3.	Haploit ve Dihaploit Bitkilerin Ploidi Düzeylerinin Belirlenmesi	116
5.4.	Dihaploit Bitkilerin Dayanıklılık Testleri İle Doğrulanması	117
6.	KAYNAKLAR LİSTESİ	119

TABLO LİSTESİ**SAYFA**

Tablo 3.1.	Proje tarla koşullarında kullanılan materyal ve özellikleri.	20
Tablo 3.2.	Farklı varyetelere ait ayçiçeği köklerinden karyotip elde etmek amacıyla köklere uygulanan ön muamele yöntemleri.	26
Tablo 3.3.	Farklı kromozom boyar maddelerin kullanıldığı Feulgen reaksiyonları ve uygulama koşulları.	27
Tablo 3.4.	Çalışmada kullanılan yarı katı MS temel besin ortamına ait makro-mikro elementler ile vitamin ve karbonhidrat kaynaklarına ait miktarlar.	29
Tablo 3.5.	Başlangıç besin ortamı kombinasyonları.	30
Tablo 3.6.	Rejenerasyon besin ortamı kombinasyonları.	30
Tablo 3.7.	Anter kültüründe kullanılan genotipler, uygulama çeşitleri ve bitki büyüme düzenleyicileri kombinasyonları.	31
Tablo 3.8.	Anter kültüründe kullanılan genotipler, uygulama çeşitleri.	31
Tablo 3.9.	Başlangıç ve rejenerasyon besin ortamı kombinasyonları.	32
Tablo 3. 10.	Optimizasyonu gerçekleştirilen protokoller ve ana adımları.	39
Tablo 3.11.	Çalışmada kullanılan bitki materyali, özellikleri ve uygulanan dozlar ile çiçek kodları.	44
Tablo 3.12.	Çalışmada kullanılan besi ortamları ve içerikleri.	47
Tablo 4.1.	Farklı dört genotipe ait anterlerin farklı zaman aralıklarında sıcak uygulamaya (+35 °C) tabi tutulup değişik oksin çeşidi içeren 3 çeşit besi ortamına alındıktan sonraki ortalama anter, kallus, embriyojenik kallus, % kallus, % embriyojenik kallus rejenerasyon miktarı.	67
Tablo 4.2.	Farklı dört genotipe ait anterlerin farklı zaman aralıklarında soğuk uygulamaya (+4 °C) tabi tutulup değişik oksin çeşidi içeren 3 çeşit besin ortamına alındıktan sonraki ortalama anter, kallus, embriyojenik kallus, % kallus, % embriyojenik kallus ve rejenerasyon miktarı.	68
Tablo 4.3.	Farklı genotiplerde farklı zaman aralıklarındaki soğuk ön uygulamaları takiben farklı besin ortamlarındaki üç tekrar sonucundaki ortalama anter, kallus, embriyojenik kallus, % kallus, % embriyojenik kallus ve rejenerasyon değerleri.	83
Tablo 4.4.	Farklı genotiplerde farklı zaman aralıklarındaki sıcak ön uygulamaları takiben farklı besin ortamlarındaki üç tekrar sonucundaki ortalama anter, kallus, embriyojenik kallus, % kallus, % embriyojenik kallus ve rejenerasyon değerleri.	85
Tablo 4.5.	Optimizasyonu gerçekleştirilen protokoller ve sonuçları.	94

Tablo 4.6.	Polen ışınlama ve tozlama tarihleri ile tozlama yapılan hatlar.	95
Tablo 4.7.	Tozlama sonrası çiçek kafası hasat tablosu.	97
Tablo 4.8.	Embriyo kurtarma çalışmalarında kullanılan A, D ve FM kodlu besin ortamlarında elde edilen çimlenme oranları.	102

ŞEKİL LİSTESİ**SAYFA**

Şekil 2.1.	Dünya bitkisel ham yağ üretimi (milyon ton) (2017 yılı ayçiçeği raporu, 2018).	4
Şekil 2.2.	Türkiye'nin yağlık ayçiçeği tohumu ithalat ve ihracatı (2017 yılı ayçiçeği raporu, 2018).	5
Şekil 2.3.	<i>In situ</i> ve <i>in vitro</i> 'da haploid bitkilerin meydana gelişi (Forster ve ark., 2007).	11
Şekil 2.4.	Işınlanmış polen ile haploid embriyo uyartımının aşamaları (Cuny, 1992).	15
Şekil 3.1.	Donör bitkilerin çimlenme ve gelişme safhaları.	21
Şekil 3.2.	Bitki yetiştirme odasında yetiştirilen farklı kombinasyonlara ait 2-3 haftalık fideler.	21
Şekil 3.3.	Proje materyali Edirne'de TTAE arazisinde ve kuru şartlarda yetiştirilmiştir (2016 yılında çekilen fotoğraf).	22
Şekil 3.4	TTAE arazisinde yetiştirilen farklı kombinasyonlara ait bitkiler (A) ve kapitulumları (B).	23
Şekil 3.5.	Tarlada yetişen uygun boyuttaki kapitulumların bitkiden ayrılarak doku kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere M. Ü.'ne transferi için hazırlanması.	24
Şekil 3.6.	Mikrospor evresindeki çiçekçik boyutunun belirlenmesi: (A) binoküler mikroskopta çiçekçik boyutunun ölçülmesi (B) lam üzerine alınan çiçekçikler üzerine aseto- orsein damlatılması (C) çiçekçiklerin ezilmesi (D) orta-geç tek nukleuslu evredeki mikrosporların ışık mikroskobunda görüntülenmesi	24
Şekil 3.7.	Kapitulum yüzey sterilizasyonu aşamaları (a) kapitulumların tween-20 ile muamelesi (b) kapitulumların sodyum hipokloritte çalkalanması (c) kapitulumların suyla yıkanması.	28
Şekil 3.8.	Anter izolasyon basamakları (a) Uygun safhada mikrospor içeren kapitulum (b) kapitulumun dış yapraklarının ayıklanması (c) uygun çiçekçiklerin belirlenmesi (d) anter izolasyonun yapılması.	28
Şekil 3.9.	Mikrospor kültürü çalışmasında izlenen adımlar.	33
Şekil 3.10.	Restorer ve CMS hatlara ait materyalin Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü'ne ait araziye ekimi (A,B,C).	41
Şekil 3.11.	Ayçiçeği Bitkisinin Fenolojik Dönemleri (Altta rakamlar ekimden sonraki günleri göstermektedir (BASF, 2008).	42

Şekil.3.12.	Bez torbalar ile çiçekleri izole edilen bitkiler.	42
Şekil 3.13.	a) El ile emaskülasyon, b) Çeşme suyu ile yıkama, c) Torbalama	43
Şekil 3.14.	Işınlanmış ayçiçeği polenleri ve ışınlama dozlar bilgilendirme etiketleri.	44
Şekil 3.15.	A) Işınlama öncesi taç yaprakların ayrılması, B) Polene bulanmış çanak yapraklar kullanılarak el ile tozlaştırma, C) Tozlama sonrası torbalanarak dışarıdan gelecek polen kaynaklarına karşı izole edilmiş çiçekler	45
Şekil 3.16.	Işınlama sonrası tozlama ile elde edilen olgunlaşmamış tohumların ayıklanması ve yüzey sterilizasyonu.	46
Şekil 3.17.	Tozlaşmadan 14 gün sonra IMI 044 (CMS) hattına ait olgunlaşmamış embriyolar.	46
Şekil 3.18.	Kültürler için 25°C sıcaklık 6000 lux ışık şiddeti ve 16/8 saatlik fotoperiyot uygulanan bitki yetiştirme odası (A) ve odanın otomasyon sistemine ait bilgisayar yazılım kontrol ekranı (B).	48
Şekil 3.19.	<i>In vitro</i> bitkiciklerin besin ortamından ayrılması ve besin ortamı kalıntılarından kurtarma (A,B), steril toprak içeren plastik viollere dikim (C, D, E), dış ortama alıştırma (F) aşamaları.	49
Şekil 3.20.	Apikal uçlara pamuğa emdirilmiş kolşisin uygulaması.	50
Şekil 3.21.	Flow analizinin adımları.	51
Şekil 3.22.	Apikal uçlara pamuğa emdirilmiş kolşisin uygulaması.	62
Şekil 4.1.	Farklı boyut ve safhalardaki ayçiçeği kapitulumları.	52
Şekil 4.2.	Farklı boyutlardaki çiçekçikler bunlara ait mikrospor safhaları ve polen görünümleri.	53
Şekil 4.3.	A. SURES K2 AD SN 2/15 varyetesinde anter genel görünüşü. B. SURES K2 AD SN 2/15 varyetesinde çeper tabakaları ve tek nukleuslu mikrosporlar (ok). C. SURES K2 AD SN 2/15 varyetesinde PAS ile boyama sonucunda görülen çözünmeyen polisakkaritlerin birikimi. D. SURES K2 AD SN 2/15 varyetesinde Coomassie parlak mavisi ile boyama sonucunda görülen protein birikimi.	44
Şekil 4.4.	A. IMI K2 R SN 7/15 varyetesinde anter genel görünüşü. B. IMI K2 R SN 7/15 varyetesinde çeper tabakaları ve tek nukleuslu mikrosporlar (ok). C. IMI K2 R SN 7/15 varyetesinde PAS ile boyama sonucunda görülen çözünmeyen polisakkaritlerin birikimi. D. IMI K2 R SN 7/15 varyetesinde Coomassie parlak mavisi ile boyama sonucunda görülen protein birikimi.	55
Şekil 4.5.	A. IMI K2 AD SN 2/15 varyetesinde anter genel görünüşü. B. IMI K2 AD	56

	SN 2/15 varyetesinde çeper tabakaları ve tek nukleuslu mikrosporlar (ok). C. IMI K2 AD SN 2/15 varyetesinde PAS ile boyama sonucunda görülen çözünmeyen polisakkaritlerin birikimi. D. IMI K2 AD SN 2/15 varyetesinde Coomassie parlak mavisi ile boyama sonucunda görülen protein birikimi.	
Şekil 4.6	A. SURES K2 R SN 9/15 varyetesinde anter genel görünüşü. B. SURES K2 R SN 9/15 varyetesinde çeper tabakaları ve tek nukleuslu mikrosporlar (ok). C. SURES K2 R SN 9/15 varyetesinde PAS ile boyama sonucunda görülen çözünmeyen polisakkaritlerin birikimi. D. SURES K2 R SN 9/15 varyetesinde Coomassie parlak mavisi ile boyama sonucunda görülen protein birikimi.	57
Şekil 4.7.	A. IMI K2 R SN 25/15 varyetesinde anter genel görünüşü. B. IMI K2 R SN 25/15 varyetesinde çeper tabakaları ve tek nukleuslu mikrosporlar (ok). C. IMI K2 R SN 25/15 varyetesinde PAS ile boyama sonucunda görülen çözünmeyen polisakkaritlerin birikimi. D. IMI K2 R SN 25/15 varyetesinde Coomassie parlak mavisi ile boyama sonucunda görülen protein birikimi.	58
Şekil 4.8.	A. IMI K2 R SN 22/15 varyetesinde anter genel görünüşü. B. IMI K2 R SN 22/15 varyetesinde çeper tabakaları ve tek nukleuslu mikrosporlar (ok). C. IMI K2 R SN 22/15 varyetesinde PAS ile boyama sonucunda görülen çözünmeyen polisakkaritlerin birikimi. D. IMI K2 R SN 22/15 varyetesinde Coomassie parlak mavisi ile boyama sonucunda görülen protein birikimi.	59
Şekil 4.9.	IMI-K0-R-SN-7/13 (A), IMI-K3-R-SN-8/13 (B), SURES-K5-R-SN-4/13 (C) ve SURES-K0-A-SN-1/13 (D) örneklerinde kromozom analizleri. $2n=34$.	59
Şekil 4.10.	α -bromonaftalen (A) ve buzlu su (B) ön uygulamalarının kullanımı ile gerçekleştirilen kromozom analizleri.	60
Şekil 4.11.	%0,04 kolhisin ön muamelesinin kullanımı ile SURES-K2-AD-SN-2/15 (A) ve IMI-K2-R-SN-25/15 (B) örneklerinde ezme preparat yöntemi ile gerçekleştirilen kromozom analizleri ($2n=34$).	60
Şekil 4.12.	%0,04 kolhisin ön muamelesinin kullanımı ile IMI-K2-R-SN-7/15 örneğinde karyotip analizi: A: Metafaz kromozomlarının eldesi, $2n=34$, B: Yazılım kullanılarak her bir kromozomun sınırlarının belirlenmesi, C: Kromozom kol, boy uzunluklarının ölçüm sonuçlarının değerlendirilmesi sonucu homolog kromozomların belirlenmesi (17 homolog kromozom	61

	çifti) ve karyogram eldesi, D: idiogram eldesi.	
Şekil 4.13	%0,04 kolhisin ön muamelesinin kullanımı ile SURES-K2-R-SN-9/15 örneğinde karyotip analizi: A: Metafaz kromozomlarının eldesi, 2n=34 , B: Yazılım kullanılarak her bir kromozomun sınırlarının belirlenmesi, C: Kromozom kol, boy uzunluklarının ölçüm sonuçlarının değerlendirilmesi sonucu homolog kromozomların belirlenmesi (17 homolog kromozom çifti) ve karyogram eldesi, D: idiogram eldesi.	62
Şekil 4.14.	%0,04 kolhisin ön muamelesinin kullanımı ile SURES-K2-AD-SN-2/15 örneğinde karyotip analizi: A: Metafaz kromozomlarının eldesi, 2n=34 , B: Yazılım kullanılarak her bir kromozomun sınırlarının belirlenmesi, C: Kromozom kol, boy uzunluklarının ölçüm sonuçlarının değerlendirilmesi sonucu homolog kromozomların belirlenmesi (17 homolog kromozom çifti) ve karyogram eldesi, D: idiogram eldesi.	63
Şekil 4.15.	%0,04 kolhisin ön muamelesinin kullanımı ile IMI-K2-R-SN-25/15 örneğinde karyotip analizi: A: Metafaz kromozomlarının eldesi, 2n=34 , B: Yazılım kullanılarak her bir kromozomun sınırlarının belirlenmesi, C: Kromozom kol, boy uzunluklarının ölçüm sonuçlarının değerlendirilmesi sonucu homolog kromozomların belirlenmesi (17 homolog kromozom çifti) ve karyogram eldesi, D: idiogram eldesi.	64
Şekil 4.16.	%0,04 kolhisin ön muamelesinin kullanımı ile IMI-K2-R-SN-22/15 örneğinde karyotip analizi: A: Metafaz kromozomlarının eldesi, 2n=34 , B: Yazılım kullanılarak her bir kromozomun sınırlarının belirlenmesi, C: Kromozom kol, boy uzunluklarının ölçüm sonuçlarının değerlendirilmesi sonucu homolog kromozomların belirlenmesi (17 homolog kromozom çifti) ve karyogram eldesi, D: idiogram eldesi.	65
Şekil 4.17.	%0,04 kolhisin ön muamelesinin kullanımı ile IMI-K2-AD-SN-2/15 örneğinde karyotip analizi: A: Metafaz kromozomlarının eldesi, 2n=34 , B: Yazılım kullanılarak her bir kromozomun sınırlarının belirlenmesi, C: Kromozom kol, boy uzunluklarının ölçüm sonuçlarının değerlendirilmesi sonucu homolog kromozomların belirlenmesi (17 homolog kromozom çifti) ve karyogram eldesi, D: idiogram eldesi.	66
Şekil 4.18.	İMİ K2 AD SN 2/15 genotipinden gelişen embriyogenik kallus (A) , gövde rejenerasyon (B).	69
Şekil 4.19.	İMİ K2 R SN 7/15 genotipinden gelişen embriyogenik kallus (A), kök rejenerasyonu (B).	69
Şekil 4.20.	İMİ K2 R SN 22/15 genotipinden gelişen embriyogenik kallus (A, B).	70

Şekil 4.21.	İMİ K2 R SN 25/15 genotipinden gelişenembriyojenik kallus (A), SURES K2 AD SN 2/15 genotipinden gelişen embriyojenik kallus (B).	70
Şekil 4.22.	SURES K2 R SN 9/15 genotipinden gelişen embriyojenik kallus.	70
Şekil 4.23.	Soğuk uygulama ile genotip ve besiyeri içeriklerinin % kallus eldesi üzerine etkisi.	71
Şekil 4.24.	Soğuk uygulama ile genotip ve besiyeri içeriklerinin % kallus eldesi üzerine etkisi.	71
Şekil 4.25.	Sıcak uygulama ile genotip ve farklı besiyeri içeriklerinin % kallus eldesi üzerine etkisi.	72
Şekil 4.26.	Sıcak uygulama ile genotip ve besiyeri içeriklerinin % embriyogenik kallus eldesi üzerine etkisi.	72
Şekil 4.27.	Tüm uygulamalarda genotiplere göre elde edilen % kallus oranları.	73
Şekil 4.28.	Tüm uygulamalarda genotiplere göre elde edilen % embriyogenik kallus oranları.	73
Şekil 4.29.	Tüm uygulamalarda besiyeri içeriğine göre elde edilen % kallus oranları.	74
Şekil 4.30.	Tüm uygulamalarda besiyeri içeriğine göre elde edilen % embriyogenik kallus oranları.	74
Şekil 4.31.	11 günlük kallus (A),16 günlük kallus(B), 23 günlük kallus (C),28 günlük kallus (D).	75
Şekil 4.32.	G6 genotipine ait 4 farklı besin ortamındaki anterlerin 1 aylık gelişimleri	76
Şekil 4.33.	G6 genotipine ait A3 ortamındaki kallus örnekleri.	76
Şekil 4.34.	G2 genotipine ait kallus örnekleri.	77
Şekil 4.35.	G3 genotipine ait embriyojenik kallus (A), G5 genotipine ait embriyojenik kallus (B).	77
Şekil 4.36.	G1 genotipinden gelişen; 24 saat soğuk uygulama A4 besin ortamı içeriğine ait rejenerasyon (A), 48 saat soğuk uygulama A4 besin ortamı içeriğine ait rejenerasyon (B), 72 saat soğuk uygulama A4 besin ortamı içeriğine ait rejenerasyon (C).	78
Şekil 4.37.	G2 genotipinden gelişen; 48 saat soğuk uygulama A4 besin ortamı içeriğine ait rejenerasyon (A), 48 saat soğuk uygulama A4 besin ortamı içeriğine ait rejenerasyon (B).	78
Şekil 4.38.	G3 genotipinden gelişen; 4 gün sıcak uygulama A4 besin ortamı içeriğine ait rejenerasyon (A), G4 genotipinden gelişen, 2 gün sıcak uygulama A1 besin ortamı içeriğine sahip rejenerasyon (B), 2 gün sıcak uygulama A1 besin ortamı içeriğine sahip rejenerasyon (C).	78
Şekil 4.39.	G5 genotipinden gelişen; 8 gün sıcak uygulama A4 besin ortamı	78

	içeriğine ait rejenerasyon (A), 8 gün sıcak uygulama A1 besin ortamı içeriğine ait rejenerasyon (B), 24 saat soğuk uygulama A4 besin ortamı içeriğine ait rejenerasyon (C).	
Şekil 4.40.	G6 genotipinden gelişen; 4 gün sıcak uygulama A4 besin ortamı içeriğine ait rejenerasyon (A), 4 gün sıcak uygulama A4 besin ortamı içeriğine ait rejenerasyon (B).	79
Şekil 4.41.	G5 genotipinden gelişen; 24 saat soğuk uygulama A4 besin ortamı içeriğine ait rejenerasyon (A), 1 ay sonraki gelişimi (B).	79
Şekil 4.42.	G5 genotipinden gelişen; 4 gün sıcak uygulama A4 besin ortamı içeriğine ait rejenerasyon (A), 1 hafta sonraki gelişimi (B), 1 ay sonraki gelişimi (C).	79
Şekil 4.43.	G2 genotipinden gelişen; 24 saat soğuk uygulama A3 besin ortamı içeriğine ait rejenerasyon (A), 10 gün sonraki gelişimi (B)	80
Şekil 4.44.	G2 genotipinden gelişen; 48 saat soğuk uygulama A4 besin ortamı içeriğine ait rejenerasyon (A), 1 hafta sonraki gelişimi (B). 6 hafta sonraki gelişimi (C).	80
Şekil 4.45.	G6 genotipinden gelişen; 4 gün sıcak uygulama A4 besin ortamı içeriğine ait rejenerasyon (A), 1 hafta sonraki gelişimi (B). 1 ay sonraki gelişimi (C).	80
Şekil 4.46.	G6 genotipinden gelişen; ;4 gün sıcak uygulama A1 besin ortamı içeriğine ait rejenerasyon (A), 1 hafta sonraki gelişimi (B). 1 ay sonraki gelişimi (C).	81
Şekil 4.47.	G6 genotipinden gelişen; 8 gün sıcak uygulama A4 besin ortamı içeriğine ait rejenerasyon (A), 1 hafta sonraki gelişimi (B). 17 gün sonraki gelişimi (C).	81
Şekil 4.48.	G6 genotipinden gelişen; 8 gün sıcak uygulama A1 besin ortamı içeriğine ait rejenerasyon (A), 1 hafta sonraki gelişimi (B). 17 gün sonraki gelişimi (C).	81
Şekil 4.49.	G1 genotipinden gelişen; 2 gün sıcak uygulama A4 besin ortamı içeriğine ait rejenerasyon (A), 10 gün sonraki gelişimi (B). 3 hafta sonraki gelişimi (C).	82
Şekil 4.50.	G3 genotipinden gelişen; 48 saat soğuk uygulama A2 besin ortamı içeriğine ait rejenerasyon (A), 24 gün sonraki gelişimi (B).	82
Şekil 4.51.	G6 genotipinden gelişen; 8 gün sıcak uygulama A2 besin ortamı içeriğine ait rejenerasyon (A), 16 gün sonraki gelişimi (B).	82
Şekil 4.52.	Soğuk uygulama ile genotip ve farklı besin ortamlarının % kallus eldesi	82

	üzerine etkisi.	
Şekil 4.53.	Sıcak uygulama ile genotip ve farklı besin ortamlarının % kallus eldesi üzerine etkisi.	87
Şekil 4.54.	Soğuk ön uygulama, genotip ve farklı besin ortamlarının % embriyojenik kallus eldesi üzerine etkisi.	88
Şekil 4.55.	Sıcak ön uygulama, genotip ve farklı besin ortamlarının % embriyojenik kallus eldesi üzerine etkisi.	88
Şekil 4.56.	Soğuk ön uygulama, genotip ve farklı besin ortamlarının % rejenerasyon üzerine etkisi.	89
Şekil 4.57.	Sıcak ön uygulama, genotip ve farklı besin ortamlarının % rejenerasyon üzerine etkisi	89
Şekil 4.58.	Besin ortamı dikkate alınmaksızın genotipin % kallus üzerine etkisi.	90
Şekil 4.59.	Besin ortamı dikkate alınmaksızın genotipin % embriyojenik kallus üzerine etkisi.	90
Şekil 4.60.	Besin ortamı dikkate alınmaksızın genotipin % rejenerasyon üzerine etkisi.	91
Şekil 4.61.	Genotip dikkate alınmaksızın besin ortamının % kallus üzerine etkisi.	91
Şekil 4.62.	Genotip dikkate alınmaksızın besin ortamının % embriyojenik kallus üzerine etkisi.	92
Şekil 4.63.	Genotip dikkate alınmaksızın besin ortamının % rejenerasyon üzerine etkisi.	93
Şekil 4.64.	Laboratuvara transferi sağlanan çiçek tablaları.	98
Şekil 4.65.	Kültüre alındıktan bir hafta sonra çimlenmiş olan embriyolar.	102
Şekil 4.66.	Toprağa şaşırtılan örneklerin streç film ile sarılarak hızlı nem kaybetmesi önlenmesi.	103
Şekil 4.67.	Torbalanan çiçek kafaları.	104
Şekil 4.68.	H34 numaralı kaynaktan alınan embriyolardan elde edilen haploid bitkiye ait karyotip analizi.	106
Şekil 4.69.	Kontrol ayçiçeği bitkisinde (A) ve Işınlanmış (1kilogray) polenlerden partenogenetik gelişen tohumlardan rejenerasyonu sağlanan bitkide (B) flow analizi sonuçları.	107
Şekil 4.70.	Kontrol ayçiçeği bitkisinde (A) ve Işınlanmış (1kilogray) polenlerden partenogenetik gelişen tohumlardan rejenerasyonu sağlanan bitkide (B) flow analizi sonuçları.	108
Şekil 4.71.	A)Besi ortamında yeni çimlenen haploid H77 B)Saksıda 2 haftalık hali C)Bir aylık hali	109

Şekil 4.73.	A)H77 hattından elde edilen haploid, B)H53 hattından elde edilen haploid, iki bitkicik de toprağa şaşırtma aşamasında kaybedildi	109
Şekil 4.74.	a)H43 hattından elde edilen haploid bitkiciğin ana sürgünü, b)Aynı bitkiciğin yan sürgünü	109
Şekil 4.75.	H77 yan sürgünlerine kolşisin çözeltisi emdirilmiş pamuk uygulaması.	110

ÖZET

Ayçiçeği ıslahında haploid tekniğini kullanarak ıslah işlerinin daha kısa ve daha etkin bir şekilde gerçekleştirilmesine katkı sağlanmasının amaçlandığı projemizde, Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü (TTAE) tarafından yürütülen ülkesel ayçiçeği ıslah proje materyali kullanılmıştır. SU (sulfonurerea) grubu ve IMI (imidazolinon) grubu herbisitlere dayanıklılık ile orobanş parazit otuna dayanıklı ana ve restorer hatlarda bitki doku kültürü tekniklerini kullanarak anter ve mikrospor kültürü yolu ile haploidlerin elde edilmesi, dihaploidizasyon ve ploidi kontrolüne yönelik flow ve kromozom analizleri gerçekleştirilmiştir.

Androgenik doku kültürü çalışmaları kapsamında anter kültürü ile sürgün rejenerasyonu ve toprağa adaptasyonu, mikrospor kültürü ile kallos rejenerasyonu elde edilmiştir. Anter kültürü ile elde rejenerasyonu sağlanan örneklerin haploid olup olmadıklarına yönelik yapılan flow analizlerinde tüm örneklerin diploid olduğu görülmüştür.

Bu nedenle projemizde B planı olarak yer alan ışınlanmış polenlerle dişi çiçeklerin tozlanması yoluyla haploid bitki elde edilmesi ve uyartım sonucu oluşan haploid embriyoların bitkiye dönüştürülebilmesi için de devamında embriyo kültürü çalışmaları da gerçekleştirilmiştir. Ülkemiz için öncü nitelikte olan bu çalışmalar sonunda 750 Gy ve 1000 Gy dozda gama ışını uygulanmış polen kaynağı ile tozlanan IMI044 (CMS) hatında ve 1000 Gy dozda gama ışını uygulanmış polen kaynağı ile tozlanan G4 K7A ÇRZ SN-4/17 (CMS) hatında, 1000 Gy dozda gama ışını uygulanmış polen kaynağı ile tozlanan SURES K2AD SN-2/15 (Emasküle) hatında **haploid bitkiler** elde edilmiştir. Bu örneklerdeki kolşisin uygulaması şeklinde gerçekleştirilen dihaploidizasyon çalışmaları öncesindeki ve sonrasındaki flow analizleri ile ilgili örneklerin haploid oldukları belirlenmiştir.

Devam eden ışınlanmış polen ile tozlama sonrası embriyo kültürü çalışmaları ile flow analizi ile diploid oldukları belirlenen ve toprağa alıştırılan IMI-K2-R-SN-7/15, IMI-K2-R-SN-22/15 ve IMI-K2-AD-SN-2/15 bitkilerden tohum alınarak rejenerasyon süresi kısaltılmıştır. Bu diploid bitkilerin aslında kendiliğinden katlanarak gelişen **dihaploid bitkiler** olduğu görülmüştür. Bu dihaploid bitkilerin dayanıklılık testleri ile doğrulanması çalışmaları kapsamında, haploid tekniğiyle elde edilen ve sonra dihaploid olarak saksılara aktarılan bitki tohumları Trakya TAE bitki büyütme odasında kış döneminde yetiştirilmiştir. Yetiştirilme esnasında IMI grubu herbisit uygulanmış ve uygulamadan 1 ve 2 hafta sonra 1-9 skalasına göre "1" değerleri aldığı değerlendirilerek dayanıklı olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca saksılara ekilirken orobanş bulaştırılmış ve dayanıklı tek bitkiler belirlenmiştir. Bu şekilde IMI-K2-R-SN-7/15 (750 gray doz uygulanan restorer materyal)'den 2 adet, IMI-K2-R-SN-22/15 (750 gray doz uygulanan restorer materyal)'den 4 adet ve IMI-K2-AD-SN-2/15 (1000 gray doz uygulanan ana-maintanier materyal)'den 2 adet olmak üzere IMI grubu herbisitlere ve orobanşa dayanıklı toplam 8 adet bitki elde edilmiştir.

Tamamlanan bu proje ile dihaploid hatların elde edilmesi, 10-12 generasyonluk kendileme yöntemine karşılık ışınlanmış polen kültürü tekniklerinin kullanılmasıyla, 2 yıl gibi daha kısa sürede gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Ayçiçeği, haploid, dihaploid, androgenez, orobanş dayanıklılığı, herbisit dayanıklılığı

ABSTRACT

Our project aims to carry out more efficient and short time effort in sunflower breeding using haploid technique. The National Sunflower Project Material which is performed by Directorate of Trakya Agricultural Research Institute is used. In maintainer and restorer lines which are resistant to SU (sulfonurea) and IMI (imidazolinon) group herbicides and orobanche obtaining haploid plant, dihaploidisation and ploidy measuring (by flow cytometry and chromosome analysis) performed, using plant tissue culture techniques by anther and microspor culturing. Within the coverage of androgenic tissue culture studies, shoot regeneration and adaptation to soil with anther culture, callus regeneration with microspore culture were succeed. According to the flow analyses all of the regenerated plants by anther culture were diploid. Therefore as B plan, female flowers were pollinated with irradiated pollens for haploid plant production and after stimulation to transform a mature plant, embryo culture studies were also performed on haploid embryos. These are first studies for our country. Haploid plants were produced in IMI044 (CMS) lines pollinated with 750 Gy and 1000 Gy doses of gamma radiated pollens, G4 K7A ÇRZ SN-4/17 (CMS) lines pollinated with 1000 Gy dose of gamma radiated pollens and SURES K2AD SN-2/15 (Emascul) lines pollinated with 1000 Gy dose of gamma radiated pollens. According to the flow cytometry results, after colchicine treatment for dihaploidization the haploid samples were still haploid. After pollination with irradiated pollens, the embryo cultures were diploid determined by flow cytometry. The plantlets were transferred to soil and the seeds of IMI-K2-R-SN-7/15, IMI-K2-R-SN-22/15 and IMI-K2-AD-SN-2/15 were collected. To confirm the resistance of dihaploid plants, the plant seeds that obtained from haploid technique and converted to dihaploid were grown at plant growth room of Directorate of Trakya Agricultural Research Institute at winter term. During cultivation IMI group herbicide were applied and after 1-2 weeks of application their resistance were proved with “1” mark according to the scale 1-9. Moreover during planting orobanche infected and resistance plants were detected. Totally resistant to IMI herbicide and orobanche 8 plants [2 plant from IMI-K2-R-SN-7/15 (750 gray dose applied restorer plant), 4 plant from IMI-K2-R-SN-22/15 (750 gray dose applied restorer plant) and 2 plant from IMI-K2-AD-SN-2/15 (1000 gray dose applied maintainer plant)] were obtained. With this completed project, using irradiated pollen culture techniques against to selfing techniques for 10-12 generation, dihaploid lines were obtained for only 2 years.

Keywords: Sunflower, haploid, dihaploid, androgenesis, orobanch resistance, herbicide resistance.

1. GİRİŞ

Her türlü toprak ve çevre koşuluna kolay uyum sağlayan bir bitki olması sebebiyle günümüzde dünyanın hemen hemen her yerinde tarımı yapılan ayçiçeğinin (*Helianthus annuus* L.) ülkemiz ve dünya yağlık tohum üretimindeki önemi oldukça büyüktür.

Türkiye'nin bitkisel yağ üretimini arttırmak, ekim alanı veya birim alan verimini yükseltmek ve döviz açığını azaltmaya yönelik olarak yapılacak çalışmalar, stratejik ve ekonomik açıdan son derece önemlidir. Sürdürülebilir tarımsal kalkınma ve yetiştiriciler açısından yapılan faaliyetlerin ekonomik olabilmesi için arzu edilen özelliklere sahip çeşitlerin geliştirilmesi gerekmektedir. Ayçiçeği gibi yabancı tozlaşmanın yüksek oranda görüldüğü bitkilerde, homozigot bitkilerin üretimi hem genetik çalışmalar hem de hibrit tohum üretimi açısından önemlidir. Bitki ıslah programlarını hızlandırmada kullanılan homozigot hatların elde edilmesinde de dihaploid teknolojisi önemli bir uygulama olarak karşımıza çıkmaktadır.

Son yıllarda yabancı ayçiçeği türlerinden klasik melezlemeyle elde edilerek geliştirilen, hem orobanşı, hem de problem olan yabancı otları ekim sonrasındaki uygulamayla kontrol edebilen Imidazolinone (IMI) grubu herbisitler ve bu herbisit grubuna dayanıklı genleri içeren ayçiçeği hibritlerinin payı Trakya Bölgesi'nde mevcuttur. IMI grubuna dayanıklılık, ayçiçeği araştırmacılarını yabancı ayçiçeği populasyonlarında gerek kontrol edilen yabancı ot türlerinin sayısını arttırmak, gerekse IMI grubu herbisitlere daha ekonomik alternatifler bulmak için, transgenik olmayan diğer herbisit gruplarına dayanıklı genleri bulmaya yöneltmiştir. Bu arayışlar sonunda, ABD'de IMI dayanıklı ayçiçeğinin bulunduğu populasyonda Sulfonil Ure (SU) grubu herbisitlere dayanıklılık sağlayan genler belirlenmiş ve geriye melezleme yoluyla bu genler, kültürü yapılan ayçiçeği türlerine başarıyla aktarılmıştır. Ancak SU herbisitlerinin orobanşı tam olarak kontrol edememesi nedeniyle, özellikle de Trakya Bölgesi'nde sadece SU dayanıklı hibritler yerine, orobanşa dayanıklı bitkilere, bu dayanıklı genlerin aktarılmasıyla elde edilecek hem orobanşa dayanıklı, hem de SU dayanıklı hibritler tercih edilmektedir. Gerek doğal olarak yabancılerde, gerekse mutasyon yoluyla yurt dışında ticari çeşitler elde edilmesine rağmen, ülkemizde henüz tescil ve üretim izinli bir çeşit yoktur.

TTAE tarafından yürütülmekte olan "Hibrit Ayçiçeği Çeşit Geliştirme Projesi" kapsamında gerçekleştirilen geriye melezleme ve saflaştırma işlemleri sonucunda hem orobanşa dayanıklı, hem de IMI ve SU herbisitlerine dayanıklı çeşitler henüz geliştirilememiştir ve tüm bu özelliklerin aynı hat veya çeşitte klasik ıslah yoluyla oluşturulması uzun zaman almaktadır.

Hibrit çeşit ıslahında uzun yıllar kendileme işleminin yapılması ve bunun yanı sıra saflaştırmanın % 100 olmaması ıslahçıları dihaploidizasyon yöntemine yönlendirmiştir. Bu yöntemde bir generasyonda % 100 saf hat elde edilmesi, dihaploidizasyon tekniğinin önemini ortaya koymaktadır. Homozigot hatların elde edilmesi, konvansiyonel ıslah programlarında uzun yıllar sürmektedir ve her yıl kendileme yapmak gerekmektedir. Bitki doku kültürü

tekniklerini kullanarak anter ve mikrospor kültürü yolu ile elde edilen haploidleri bir vegetasyon süresinde dihaploid bitki haline getirerek homozigot hatların elde edilmesi mümkün olmaktadır.

Tamamlanan bu proje ile istenilen tarımsal özelliklere sahip ayçiçeği hatlarının ıslahının daha kısa sürede yapılmasına katkı sağlanacaktır.

Bu yüzden önerilen bu proje ile ıslah çalışmalarında önemli yer tutan haploid ve katlanmış haploid (Dihaploid = DH) hatların ayçiçeğinde elde edilecek olması, ayçiçeği ıslahı programlarında seleksiyon çalışmalarında zaman tasarrufu sağlayacağı gibi uzun yıllardır yürütülen "Ülkesel Ayçiçeği Araştırmaları Programı"na da ivme kazandıracaktır.

Dihaploidlerin kullanımı sadece homozigotluk elde etmede sürenin kısılması açısından değil, aynı zamanda seleksiyon etkinliğinin artmış olmasından dolayı da klasik ıslah yöntemlerine göre daha avantajlı olmaktadır.

Projemizde Edirne'de bulunan Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü (TTAE) tarafından orobanşa ile imi (imidazolinon) ve SU (sulfonururea) grubu herbisitlere dayanıklılık bakımından genetik olarak açılma gösteren ana (CMS) ve baba (restorer) materyal kullanılmıştır.

Bitki örneklerinin tarla koşullarında yetiştirilmesi, emaskülasyon, polen toplama, ışınlanmış polen ile tozlama ve elde edilen dihaploid tohumların sera koşullarında yetiştirilmesi çalışmaları TTAE tarafından gerçekleştirilmiştir. Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü (TTAE) tarafından sağlanan ilgili hatlarda *in vitro* androgenik (anter ve mikrospor) doku kültürü çalışmaları ile ışınlanmış polen ile tozlama sonrası embriyo kültürü çalışmaları Marmara Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü altyapısında mevcut bitki yetiştirme odası ve altyapı imkanları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Işınlanmış polen ile tozlama sonrası oluşan embriyolardan embriyo kültürü yoluyla bitkiler elde edilmiş ve tohumları alınmıştır. Bu şekilde IMI-K2-R-SN-7/15 (750 gray doz uygulanan restorer materyal)'den 2 adet, IMI-K2-R-SN-22/15 (750 gray doz uygulanan restorer materyal)'den 4 adet ve IMI-K2-AD-SN-2/15 (1000 gray doz uygulanan ana-maintanier materyal)'den 2 adet olmak üzere IMI grubu herbisitlere ve orobanşa dayanıklı toplam 8 adet **dihaploid bitki ülkemizde tarımı yapılan yerel çeşitlerde ilk defa elde edilmiştir.**

Birçok türde başarılı biyoteknolojik uygulamalar gerçekleştirilmiş olmasına rağmen, ayçiçeğinde, istenilen özelliklere sahip bitkilerin üretimi için, çeşitli *in vitro* yöntemlerin, özellikle de androgenik yöntemlerin kullanılması ile ilgili çalışmalar tatmin edici değildir (Ivanov ve ark, 2002).

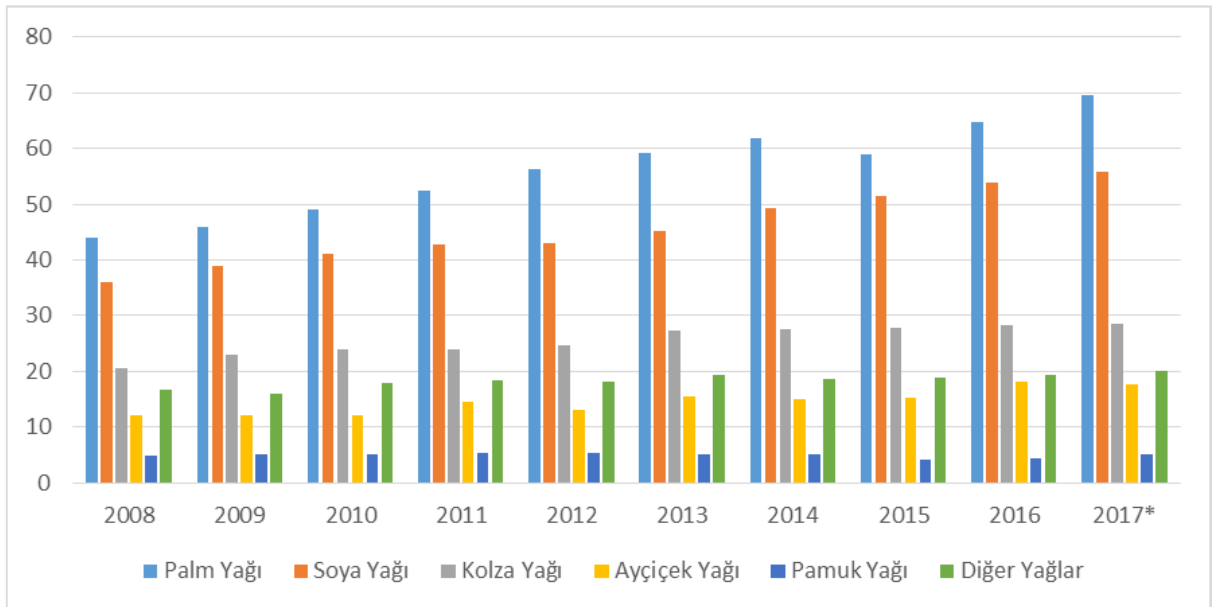
Bitki ıslahı çalışmalarında dihaploid hatların kullanımı seleksiyonda sağladığı zaman avantajı nedeniyle oldukça önemlidir. Tamamlanan bu projede de homozigot saf hatların elde

edilmesinde 10-12 generasyonluk kendileme yöntemine karşılık ışınlanmış polen ile tozlama sonucu %100 saf hatların elde edilmesi çalışmaları 2 yıl gibi daha kısa sürede gerçekleştirilmiş, aynı zamanda hem orobanşa dayanıklılık yönüyle, hem de herbisit (IMI) dayanıklılık yönüyle kontrol testleri de yapılmıştır.

TTAE tarafından yürütölmekte olan “Hibrit Ayçiçeği Çeşit Geliştirme Projesi” kapsamında gerçekleştirilen geriye melezleme ve saflaştırma işlemleri sonucunda hem orobanşa dayanıklı, hem de IMI ve SU herbisitlerine dayanıklı çeşitlerin henüz geliştirilememiştir ve tüm bu özelliklerin aynı hat veya çeşitte klasik ıslah yoluyla oluşturulması uzun zaman almaktadır. Tamamlanan bu projeden elde edilen sonuçlar, bu yönde yapılan/yapılacak ıslah çalışmalarına dihaploid saf ebevenyn hatların kazandırılarak bu amaç doğrultusunda istenilen tarımsal özelliklere sahip ayçiçeği hatlarının ıslahının daha kısa sürede yapılmasına katkı sağlanacaktır. Bu yüzden önerilen bu proje ile ıslah çalışmalarında önemli yer tutan haploid ve katlanmış haploid (Dihaploid = DH) hatların ayçiçeğinde elde edilmiş olması, ayçiçeği ıslahı programlarında seleksiyon çalışmalarında zaman tasarrufu sağlayacağı gibi uzun yıllardır yürütölen “Ülkesel Ayçiçeği Araştırmaları Programı”na da ivme kazandıracaktır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Ayçiçeği dünyada ve ülkemizde en önemli yağ bitkilerinden biri olup, ülkemizde tarımı yapılan yağlı tohumlar grubuna giren ürünleri ayçiçeği, çigit, soya, yerfıstığı, haşhaş, susam, kolza ve aspir olarak sıralayabiliriz. Ülkemizde bitkisel yağ tüketimi de son zamanlarda dünyadaki gelişmelere paralel olarak artış göstermekte ve bu alanda bitkisel yağ üretimine hammadde teşkil edecek yağlı tohumlu bitkilerin üretim alanlarını yaygınlaştırabilmek için çalışmalar da yapılmaktadır. Dünyada en önemli yağ bitkilerinden biri olan ayçiçeği ülkemizde de en fazla ekim alanına ve üretime sahip yağ bitkisidir. Türkiye’de bitkisel ham yağ üretiminin %50’si ayçiçeğinden karşılanmaktadır. Halkın genelde bitkisel yağ olarak ayçiçeği yağını tercihi ve özellikle Trakya Bölgesinde ekim nöbetinde temel bitki oluşu (Buğday-Ayçiçeği), geniş adaptasyon kabiliyetine sahip ve mekanizasyona çok uygun olması vb. nedenler ayçiçeğini, ülkemiz açısından en önemli yağ bitkisi haline getirmektedir.



Şekil 2.1. Dünya bitkisel ham yağ üretimi (milyon ton) (2017 yılı ayçiçeği raporu, 2018).

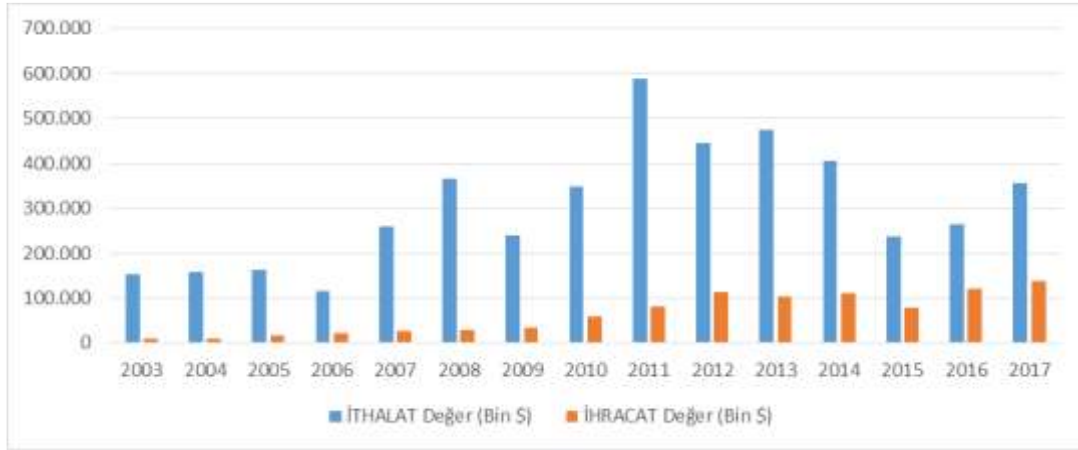
Diğer kültür bitkilerinde olduğu gibi ayçiçeği tarımında da kaliteli tohumluk kullanımı, sulama, gübreleme, hastalık ve zararlılarla zamanında mücadele ve diğer kültürel uygulamalar düzenli olarak yerine getirildiği takdirde verimin 250 kg/da’nın üzerine çıkabileceği bilinmektedir (Coşge ve ark., 2007).

Yağlı tohumlardaki üretim maliyetlerinin yüksek olması nedeniyle dış pazar fiyatlarıyla rekabet edememesi, birim alandaki getirisinin düşük olması sebebiyle, yetiştirildikleri bölgelerdeki alternatif ürünlerle rekabet edememesi, Dünya ham yağ fiyatlarının Türkiye’ye göre daha düşük olması, ürün planlamasının ve yağlı tohum üretimin artırılmasına yönelik politikaların etkin olamaması, Türkiye’de yağlı tohum üretiminin yeterli olmayışının nedenleri olarak sıralanabilmektedir. Yıllardan beri bu üretim açığını kapatabilecek bir çözüm

bulunamamıştır. Bu durum, ithalata bağımlı bitkisel yağ sektörümüzü, dünya pazarındaki dalgalanmalara karşı kırılgan kılmaktadır.

Diğer yandan son yıllarda bitkisel yağlar, gıda sektörü dışında biyodizel üretiminde kullanılmasıyla birlikte enerji sektörünün de hammaddesi haline gelmiştir. Diğer bir ifadeyle artık bitkisel yağlar; gıda, enerji ve kimyasal sektörlerde yoğun olarak kullanılan stratejik üründür. Bitkisel yağ sektörümüzde hedef, gelecek yıllarda dışa bağımlılığın azaltılmasıdır.

Bitkisel yağlar, ülkemizde yıllardan beri üretim açığı olan alanlardan biridir ve Türkiye’de bitkisel yağ sanayinin temel sorunu, hammaddede dışa bağımlılıktır (**Şekil 3**). Bundan dolayı da ülkemizde ithal edilen önemli tarım ürünleri arasında yer almaktadırlar.



Şekil 2.2. Türkiye’nin yağlık ayçiçeği tohumu ithalat ve ihracatı (2017 yılı ayçiçeği raporu, 2018).

Tarım yapılabilecek alanların hem Türkiye’de hem de dünyada üst sınırlara ulaşmış olması sebebiyle birim alandan elde edilen ürün veriminin en yüksek düzeye çıkarılmak istenmesi üreticilerin ilk hedefi olmuştur. Artan nüfusla birlikte bu nüfusun beslenme ihtiyaçlarını karşılayabilmek amacıyla verimin daha da yükseltilmesi gerekmektedir (Ahmet ve Adak, 2007). Ülkemizde kullanımı oldukça yaygın olan ayçiçeğinde yüksek olan talep ancak üretim artışı ile karşılanabilir. Kültürel tekniklerin iyileştirilmesiyle oluşacak üretim artışının yanı sıra ıslah çalışmalarının yapılmasıyla da yüksek verimli çeşitlerin geliştirilmesi başarılabılır (Alvarez ve ark., 1992; Marinkoviç, 1992; Chaudhary ve Anand, 1993; Punia ve Gill, 1994; Narayana ve Patel, 1998). Başarılı bir üretimin ön şartı, birim alanda istenen bitki sıklığının elde edilmesidir. Bunun için de ekilen tohumun çimlenerek çıkması gerekmektedir (Munsuz ve ark., 2001). Islah çalışmalarında başarıya ulaşabilmek için, önce ıslah amacının iyi belirlenmesi ve ıslah edilecek karakter ya da karakterlerin özelliklerinin iyi bilinmesi gerekir. Tohum verimini artırmak için gerçekleştirilen ıslah programlarında, farklı agronomik karakterlerin verimle olan ilişkilerinin bilinmesiyle ıslah program ve seleksiyonun doğru bir

şekilde ilerlemesi sağlanır (Alvarez ve ark., 1992; Marinkoviç, 1992; Chaudhary ve Anand, 1993; Punia ve Gill, 1994; Narayana ve Patel, 1998). İslah edilmiş kültür bitkilerinin yabancı formlarıyla karşılaştırıldıklarında birçok mantar, bakteri ve virüs hastalıkları ile zararlılara karşı daha duyarlı olduğu ve bu durumun genelde uygulanan ıslah yöntemlerinin eksikliğinden kaynaklandığı görülmüştür. İslah programlarında, seleksiyon çalışmalarında ürün kalitesi ve miktarı gibi özellikler ön planda tutulmaktadır (Özcan ve Özgen, 1996).

Kültür bitkilerinin ürün verimindeki artışı sadece yeni çeşitler geliştirmekle sağlanmamakta, ayrıca ileri yetiştirme tekniklerini kullanmak gereklidir. Herbisitlere dayanıklılık ıslahı bu iki önemli amacı da kapsamaktadır (Tan ve ark. 2005; Kaya ve Evci, 2007; Evci ve ark., 2012).

Türkiye'nin bitkisel yağ ihtiyacı, nüfus artışına ve kişi başına tüketilen yağ oranının yükselmesine paralel olarak artış göstermektedir. BM Gıda ve Tarım Örgütü'nün (FAO) 2012-2021 Tarımsal Öngörüler Raporunda, ham petrol fiyatlarındaki değişimler, zorunlu biyoyakıt uygulamaları ve güçlü gıda talebi nedeniyle önümüzdeki on yılda yağlı tohum ve türevlerinin fiyatlarında nominal artış olacağı beklentisine yer verilmektedir.

Ayçiçeği bitkisinde, tohum verimi ile bitki boyu, tabla çapı, tablada tane sayısı, 1000 tane ağırlığı ve tabla başına tohum ağırlığı gibi verim komponentleri arasında pozitif ve önemli ilişkilerin var olduğu bir çok araştırmacı tarafından vurgulanmıştır (Alvarez ve ark., 1992; Marinkoviç, 1992; Chaudhary ve Anand, 1993; Punia ve Gill, 1994; Narayana ve Patel, 1998). Ayçiçeğinde verim ve kalite açısından melez çeşitlerin daha üstün özelliklere sahip oldukları ve iki kat daha fazla verim verdikleri bildirilmiştir (Fick, 1978; Kaya, 2003). Bundan dolayı Türkiye'de halen ayçiçeği ekim alanlarında üretilen çeşitlerin tamamına yakınının hibrit çeşitler olduğu bilinmektedir (Kaya, 2003). Bu nedenle ülkemizde ve dünyada ayçiçeğinde ıslah programları genelde, hibrit ıslahına yöneliktir (Kaya ve ark., 2009). Yabancı döllenme özelliğinden dolayı hibrit çeşitlerin tohumluklarının her yıl yenilenmesi gerekmektedir. Bunun yanında, ayçiçeği tarımında başarı aynı zamanda uygun ekim zamanının belirlenmesiyle birlikte her yıl sertifikalı tohumluğun kullanılmasını da gerektirmektedir (Kaya, 2003). Ayçiçeği tarımında genelde hibrit çeşitler üretimde kullanılmasına rağmen, aynı CMS (sitoplazmik erkek kısırlık) gen kaynakları kullanılması nedeniyle, geleneksel ıslah metotları kullanılarak elde edilen çeşitlerde, genetik verimlilik kapasitesinin üst sınırına yaklaşılmıştır. Gerek ayçiçeğinde, gerekse hibrit ıslahının uygulandığı diğer türlerdeki yüksek verimin elde edildiği hibritlerde, kullanılan ebeveynler arasındaki akrabalık derecesi ne kadar düşük, yani birbirleri arasında genetik uzaklık ne kadar fazla ise, özellikle tane veriminde heterosis olarak adlandırdığımız melez azmanlığı o kadar yüksek olmaktadır (Miller ve Fick, 1997). Bu nedenle ayçiçeğinde yüksek verim için mutlaka farklı genetik kaynaklara sahip kendilenmiş ebeveyn hatlara ihtiyaç vardır. Bu farklı genler, ayçiçeğinde çok sayıdaki tek veya çok yıllık

yabani ayçiçeği türlerinde mevcut olup, bu yeni genotip kaynakların kültürü yapılan tek yıllık *Helianthus annuus* L. türüne bir an önce aktarılması gerekmektedir. Ancak bu gen kaynaklarının kullanılması, türler arası melezlemeler ile mümkün olup, bunların klasik ıslah metotlarını kullanarak elde edilmesine olanak yoktur (Bidney ve Scelonge, 1997). Bu genlerin, yabani türlerden tarımı yapılan kültür bitkilerine aktarılması, ancak biyoteknolojik metotların kullanılmasıyla mümkündür (Kaya, 2004).

Ayçiçeğinde hibrit ıslahı, sitoplazmik erkek kısırlığın (CMS: Cytoplasmic Male Sterility; Sitoplazmik Erkek Kısırlık) 1960 yılında Leclercq, bu kısırlığı onarıcı genlerin 1970 yılında Kinman tarafından keşfedilmesiyle ekonomik olarak başlamış olup, ilk hibritler 1972 yılında ABD de elde edilmiş ve 5 yıl içinde üretimin % 80 ine ulaşmıştır (Skoric, 2012). Bugünde dünya üretiminin yaklaşık % 80 inde hibrit tohum kullanılmaktadır. Ülkemizde yağlık ayçiçeğinde bu oran % 90'ın çok üzerindedir (Evcı ve ark, 2011b; 2012). Fertiliteyi yeniden sağlayacak olan restorer hatlar erkek olarak kullanılacak hatlara dominant restorer gen ve ya genlerin (Ms veya Rf) aktarılmasıyla geliştirilmektedir (Fernandez-Martinez ve ark, 2009). Saf hatların geliştirilmesinde, Genel Kombinasyon Kabiliyeti (GKK)'ni test etmek için, bir veya iki tester kullanmak yeterlidir (Miller, 1992). İyi kombinasyon kabiliyetine sahip saf hatlar, daha sonraki değerlendirmeler için, diallel melezlemeler yoluyla özel kombinasyon kabiliyetleri (ÖKK) tespit edilir.

Bitkisel üretimde birkaç işlemi birleştirerek yapılan uygulamalar, son yıllarda dünyada giderek yaygınlaşmaktadır. Bugün soya, mısır gibi birçok üründe kullanılan herbisitler ve dayanıklı gen içeren çeşitlerin kullanımı, üretim girdilerini azalttığından özellikle ABD ve bazı ülkelerdeki birçok çiftçi tarafından tercih edilmektedir. Ancak özellikle bu genlerin bitkilerin genetik yapısı değiştirilenlere yönelik yasaklayıcı uygulamalar, başta AB ülkeleri olmak üzere, ülkemiz ve bazı ülkelerde halen devam etmektedir. Bunun yanında soya, mısır, çeltik gibi bitkilerde, geri melezlemeyle yabani türlerden aktarılan IMI herbisit grubuna dayanıklı genlere sahip çeşitlerle, bu herbisitlerin çıkış sonrası uygulandığı CLEARFIELD (Temiz Tarla) adıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (Alonso ve ark., 1998; Tan ve ark. 2005).

Ayçiçeğinde IMI herbisitlerine dayanıklı genler, ilk defa ABD nin Kansas eyaletinde yedi yıl IMI grubundan Pursuit (imazethapyr) herbisiti uygulanmış bir tarlada, soya tarlasında bulunan yabani ayçiçeği bitkilerinde (*Helianthus annuus* L. - ANN-PUR) belirlenmiştir (Al-Khatib ve ark., 1998). Bu tarladan elde edilen popülasyonların tohumları embriyo kültürü ile generasyon süresi kısaltılarak, geriye melezleme yoluyla kültürü yapılan ayçiçeği ebeveyn hatlarına aktarılmış ve IMISUN olarak adlandırılarak ayçiçeği ıslahçılarının kullanımına sunulmuştur (Al-Khatib ve Miller, 2000; Miller ve Al-Khatib, 2002). Malidza ve ark. (2000), yaptıkları araştırmada, ayçiçeğindeki bu dayanıklılığın kısmi dominant bir özellik gösterdiğini

ve dayanıklı bitkilerin sadece IMI herbisit grubuna dayanıklı olduğunu, çıkış sonrası kullanılan diğer herbistlerin normal dozlarına dahi hassas olduğunu belirlemişlerdir.

Ayrıca son yıllarda BASF tarafından kimyasal mutasyonla geliştirilen yeni bir IMI herbisitlerine dayanıklılık geni de (CLHA-Plus) bulunarak kültürü yapılan türlere aktarılmış olup (Sala ve ark., 2008, 2012), ancak bu yeni gene sahip ayçiçeği hibritler henüz Avrupa da ve ülkemizde piyasada satılmaya başlamamıştır.

Ayçiçeğinde SU herbisitlerine dayanıklılık, aynı IMI herbisitlerinde olduğu gibi belirlenen Kansas popülasyonundan geriye melezleme yoluyla bu genler, kültürü yapılan ayçiçeği türlerine başarıyla aktarılmış ve SURES 1 ana (maintainer) ve SURES 2 de restorer kaynak olarak ayçiçeği ıslahçıların kullanımına sunulmuştur (Miller ve Al Khatib, 2004). SU herbisitlerine dayanıklılık dominant bir gen tarafından belirlenmekte olup, bu şekilde hibrit ıslahında tek bir ebeveynin dayanıklı olması yeterli olmaktadır (Jocic ve ark., 2011; Skoric, 2012) Ancak pratikte aşırı doz kullanımına karşılık iki ebeveyn de dayanıklı çeşitler ile tescile gidilmektedir.

Orobanş (*Orobanche cumana* Wallr.) ülkemizde, Avrupa ve Balkan ülkelerinde, ayçiçeği veriminde %100'e varan düşüşlere sebep olan bir parazit bitkidir. Bu parazit, çok sayıda ırklar oluşturmakta ve çok küçük ve fazla sayıda tohumlar içerdiğinden, kolayca yayılmakta ve böylelikle ayçiçeği üretimi yapılan alanlarda hızlı epidemilere neden olmaktadır (Kaya, 2003). Orobanş paraziti değişik çevre ve iklim koşullarında yeni fizyolojik ırklar oluşturmakta ve bunlara dayanıklı ayçiçeği geliştirilse bile tekrar ortaya çıkarak problem olabilmektedir (Vranceanu ve ark., 1980). Bu durumdan dolayı orobanş ayçiçeği üretiminde önemli bir sınırlayıcı faktör olarak ortaya çıkar. Etkili ve sürdürülebilir orobanş dayanıklılığının sağlanması ayçiçeği ıslah programlarının en önemli hedeflerinden biridir (Fernandez-Martinez ve ark., 2010; Kaya ve ark., 2012b). *Helianthus tuberosus*, *Helianthus maximiliani* ve *Helianthus debilis* gibi yabani ayçiçek türlerinde orobanşa dayanıklılık genleri belirlenmiş ve kültürü yapılan ayçiçeğine de aktarılmıştır (Fernandez-Martinez ve ark., 2009; Christov ve ark., 2009).

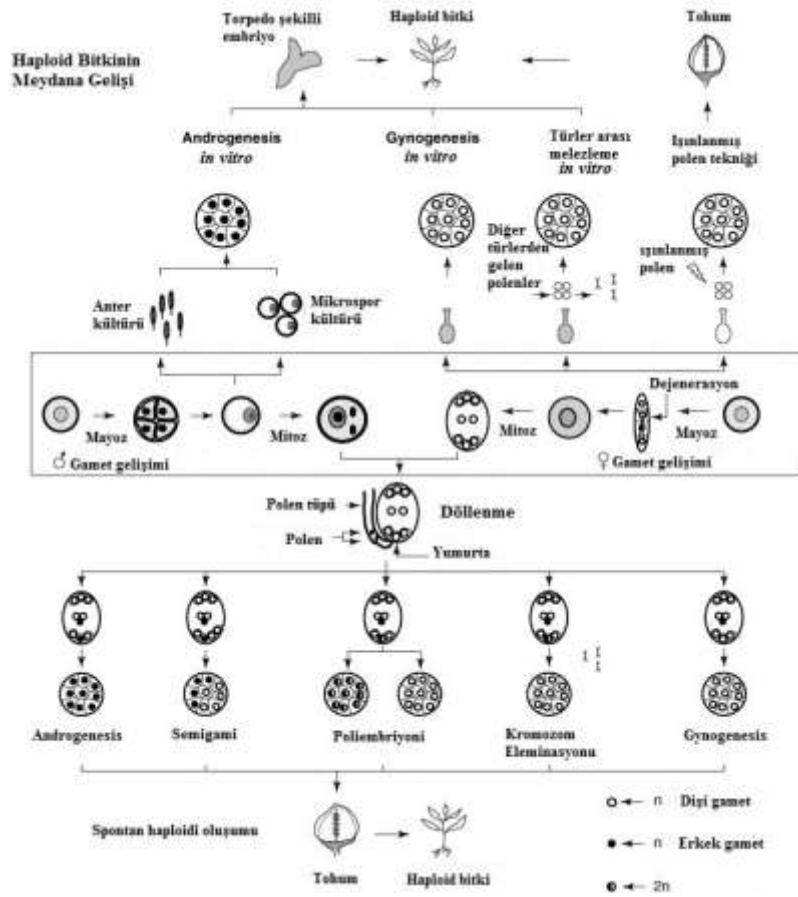
Ayçiçeği ($2n = 34$), Compositeae familyasından değerli bir yağ bitkisidir. Amerika kökenli olan ayçiçeğinin 67 kadar yabani türü bulunur. Kültürü yapılan ayçiçeği türü (*Helianthus annuus* ssp. *macrocarpus*) yabani formlarından farklı olarak tek sap üzerinde çoğunlukla tek bir büyük tabla oluşturur. Bugün dünyada tek yıllık yağ bitkileri arasında soya, kanola ve yerfıstığından sonra en fazla üretilen yağ bitkisidir (Weiss, 2000). Ayçiçeği, ülkemizde de yetiştiriciliği yapılan yağlı tohumlu bitkiler içinde, ekim alanı ve üretim miktarı bakımından birinci sırada yer almaktadır. Türkiye'ye ayçiçeği ilk defa I. Dünya Savaşı'ndan sonra Romanya ve Bulgaristan'dan gelen göçmenler tarafından getirilmiş ve Trakya bölgesinde yetiştirilmeye başlamıştır. Türkiye ayçiçeği üretiminin %70'ten fazlası bu bölgede

olmakla birlikte, son yıllarda üretimi başta İç Anadolu ve Karadeniz olmak üzere Çukurova ve Geçit bölgelerinde giderek artmaktadır. Yağlı tohumlar içerisinde, ülkemizde en fazla ekim alanına ve üretimine sahip bitki oluşu, halkın bitkisel yağ olarak ayçiçeği yağını tercihi ve özellikle Trakya Bölgesi'nde ekim nöbetinde temel bitki oluşu (buğday-ayçiçeği), ayçiçeğinin önemini daha da arttırmaktadır (Kaya, 2003). Ayçiçeğinin 2005-2012 yılları arasındaki Türkiye ve Dünya'daki ekili alan, verim ve üretim değerleri incelendiğinde ayçiçeği ekim alanları son yıllarda 605 bin hektar civarına çıkmış, üretim ise son iki yılda ortalama 1.350 bin ton olarak gerçekleşmiştir (FAO, 2013).

Diğer yandan ülkemizde ayçiçeği tarımında özellikle bazı bölgelerde büyük problem olan orobanş ve diğer yabancı otlar, herbisitlerle yeterince kontrol edilememekte ve büyük ekonomik kayıplara yol açmaktadır (Kaya, 2003a). Bu etmenlerle mücadeleye yönelik olarak klasik ıslah çalışmaları gerçekleştirilmektedir ve bu çalışmalarda genellikle kalıtım yoluyla, bitkilerin genetik yapılarındaki ve doğal yayılışlarındaki varyasyonların döllere aktarılması hedeflenmektedir. Burada istenilen karakterlerin aktarılması, türler arası melezlemelerle gerçekleştirilir ve yeni bir çeşitin geliştirilmesi uzun zaman ve yoğun emek alan bir süreçtir. Bu süreçte her generasyonda elde edilen çok sayıdaki birey birçok özellik açısından fenotipik özelliklerden yararlanılarak, morfolojik markörler aracılığıyla gözlemlenir, test edilir ve bir sonraki generasyon için uygun genotipler seçilerek ıslah çalışması devam ettirilir. Bu şekilde fenotipik özelliklere dayalı geleneksel seleksiyonlarda, markörlerin azlığı, pleiotropik ve epistatik etkilerin bulunması, morfolojik karakterlerin değişken çevresel koşullardan etkileniyor olması gibi sorunlarla da karşı karşıya kalınmaktadır (Melchinger ve ark., 1990). Böyle uzun yıllara gereksinim duyan saflaştırma işlemi, haploid bitkiler ile bu haploid bitkilerin kromozom sayılarının katlanması sayesinde %100 homozigot saf dihaploid hatların elde edilebildiği dihaploidizasyon yöntemiyle daha kısa zamanda tamamlanabilmektedir. Haploid bitkiler *in situ* kaynaklı olabilirse de doğal koşullarda haploidlere ulaşma olasılığı çok düşüktür. Her bir lokustaki allelerden sadece bir seriyi içeren ve bu özellikleri ile ıslah çalışmalarında önemli yer tutan haploid bitkilerin elde edilmesinde kullanılan başlangıç materyalleri gametlerdir (Sarı ve ark., 1994; Dunwell, 2010) ve erkek veya dişi organların haploidiye karşı uyarılmaları ile *in vitro* koşullarda elde edilebilmektedir (Elialtıoğlu ve ark., 2001; Germanà, 2011). Ancak bir ıslah programında haplodizasyon tekniğini kullanabilmek ve başarılı olmak için, öncelikle genotiplerin haploidiye yatkınlığı önemlidir. Doğada androgenesis, gynogenesis, semigami, polyembriyoni veya kromozom eliminasyonu yollarından birisi ile oluşan spontan haploidlerin oluşum frekansı % 0.001–0.01 gibi çok düşük düzeydedir. *In situ* uyarımla uzak akrabalar arası melezlemeler, tozlanmanın geciktirilmesi, abortif veya ışınlanmış polenlerle tozlama, sıcaklık şokları, değişik kimyasallar, hormon uygulamaları, "X" veya "UV" ışınları ile haploid bitki elde edilebilir. Diğer taraftan *in*

vitro uyartımla, androgenesis (anter veya mikrospor kültürü) veya gynogenesis (ovül kültürü, ovaryum kültürü veya embriyo kurtarma) yöntemleri ile de haploid bitki elde edilebilmektedir. Ancak bunlar arasında en yaygın olarak kullanılan ve en fazla başarının sağlandığı yöntem anter kültürüdür. Bu nedenle sunulan bu proje önerisinde haploid bitki eldesi androgenesis ile (anter ve mikrospor kültürleri aracılığı ile) gerçekleştirilecek ve TTAE tarafından hazırlanan farklı dayanıklılık kaynakları (orobanşa dayanıklılık, SU ve Imi grubu herbisitlere dayanıklılık) içeren ana (CMS) ve baba (restorer) hatlarının melezlenmesi ile geliştirilen 4 farklı kombinasyona ait tohumlar (F₁, F₂ ve bazı kombinasyonlarda F₄) bu proje kapsamında materyal olarak kullanılacaklardır. Böylelikle proje sonunda elde edilecek dihaploid bitkilerde gerçekleştirilecek orobanş ve herbisit dayanıklılığı kontrol testleri ile hem orobanş hem de Imidazolinone (Imi) grubu herbisitlere dayanıklı dihaploid restorer hatlar ile yine hem orobanş hem de SulfonilUrea (SU) grubu herbisitlere dayanıklı dihaploid restorer hatların elde edilmesi mümkün olacaktır.

In vitro androgenesis (anter ya da mikrospor kültürü) tekniği ile haploid ve dihaploid bitkilerin üretimi bitki ıslahında ve temel araştırmalarda kullanılan önemli bir tekniktir. Bu tekniğin diğer *in vitro* haploid bitki elde etme tekniklerine göre avantajı; bir anter içerisinde binlerce mikrosporum bulunması ve bir anterden çok sayıda haploid bitki elde edilebilmesidir. Anter / mikrospor kültürünün temel prensibi; normal olarak erkek gameti oluşturacak olan polen hücresinin gelişimini durdurmak ve somatik hücrelerde olduğu gibi polen hücresini direkt olarak embriyo oluşturmaya zorlamaktır (**Şekil 3**).



Şekil 2.3. *In situ* ve *in vitro*'da haploid bitkilerin meydana gelişi (Forster ve ark., 2007).

Totipotent özellikteki binlerce mikrospora sahip bir anterden, uygun *in vitro* koşullarda çok sayıda haploid bitkinin elde edilebildiği bu teknikte; elde edilen bitkilerin kromozom sayılarının katlanmasıyla dihaploid hale getirilen bitkiler %100 homozigot karakter kazanmakta ve F_1 hibrit çeşit ıslahında ebeveyn olarak kullanılabilme şansına sahip olmaktadır (Ellialtıoğlu ve ark., 2001).

Haploid bitkiler kök, dal, çiçek, yaprak ve bazı durumlarda meyveler de vererek normal gelişim gösterirler. Ancak, haploid bitkilerin doku ve organlarını oluşturan hücreler diploitlere göre biraz daha küçük olduğundan, haploid bireyler morfolojik olarak diploitlerin biraz küçültülmüş örnekleridir (Bilge, 1982; Emiroğlu, 1982). Haploid bitkilerin boyları daha kısa, yaprakları dar ve küçük, çiçekleri küçük ve polen oluşturmamaları nedeniyle kısırdırlar, tohum bağlayamazlar (Emiroğlu, 1980; Abak, 1993; Çağlar ve Abak, 1999). Bu nedenle haploidlerin ıslahta kullanılabilmeleri için kromozomlarının katlanarak dihaploid duruma getirilmeleri gerekmektedir.

Haploid bitkiler kök, dal, çiçek, yaprak ve bazı durumlarda meyveler de vererek normal gelişim gösterirler. Ancak, haploid bitkilerin doku ve organlarını oluşturan hücreler diploitlere göre biraz daha küçük olduğundan, haploid bireyler morfolojik olarak diploitlerin biraz

küçültülmüş örnekleridir (Bilge, 1982; Emiroğlu, 1982). Haploid bitkilerin boyları daha kısa, yaprakları dar ve küçük, çiçekleri küçük ve polen oluşturmamaları nedeniyle kısırdırlar, tohum bağlayamazlar (Emiroğlu, 1980; Abak, 1993; Çağlar ve Abak, 1999). Bu nedenle haploidlerin ıslahta kullanılabilimleri için kromozomlarının katlanarak dihaploid duruma getirilmeleri gerekmektedir.

Anter kültürü tekniği ilk defa *Datura innoxia* (Guha ve Maheshwari, 1964) bitkisinde başarı ile kullanılmıştır. Çin'de yapılan araştırmalarda anter kültürü tekniği kullanılarak 81 çeltik ve 20 buğday çeşit/hattı ile 100 mısır hattı geliştirilmiştir. Yine Avrupa'nın anter kültürü yoluyla geliştirilmiş, ilk buğday çeşidi 'Florin' adı ile tescil edilmiştir (Veilleux, 1994).

Haploidi tekniğinin temelini kromozom katlanması ve % 100 homozigot saf hatların geliştirilmesi oluşturmaktadır. Kromozom katlanması kimyasal maddeler ile gerçekleştirilmektedir. Kolhisin kromozom katlaması için çalışmalarda kullanılan en yaygın kimyasal maddedir (Ellialtıoğlu ve ark., 2000). Haploidi teknikleri özellikle ıslah çalışmalarında, yabancı döllen türlerdeki 10-12, kendine döllen türlerdeki 5-7 generasyonluk kendileme süresini tek generasyona indirerek mutlak homozigotluğu sağlar. F₁ hibrit çeşit ıslahında, dihaploid bitkilerden elde edilen saf hatlar ebeveyn olarak kullanılabilir. İzole edilmiş mikrosporların kültüre alınması bitki ıslahında homozigot hatların eldesinde oldukça önemlidir (Guo ve Pulli, 2000; İslam ve ark., 2013). Mikrosporlardan oluşan embriyolar yüksek rejenerasyon kapasitesine sahip oldukları için direkt DNA transferi ve gen transferi çalışmalarında etkin şekilde faydalanılabilmektedir. Ayrıca, haploid hücre veya protoplastlar sayesinde farklı patojenler ve bunların fizyolojik ırklarına, antibiyotiklere, toksinlere, herbisitlere, tuza, soğuğa veya sıcağa dayanıklı mutantlar *in vitro* seleksiyon imkânı ile küçük bir alanda çok kısa sürede, ekonomik şekilde seçilebilmektedir. Bunların dışında; ıslah etkinliğinin artırılmasında, saf süper erkek bireyler elde edilmesinde, mutasyon ıslahında, süs bitkilerinin bodurlaştırılmasında, genom haritalarının çıkartılmasında, QTL analizlerinde polijenik karakterlerin haritalanmasında haploid bitkiler özellikle ıslahçı ve genetikçiler için sonsuz avantajlar sunmaktadır (Abak, 1986; Wenzel ve Foroughi - Wehr, 1994; Ferrie ve Keller, 1997; Hatipoğlu, 1999; Ellialtıoğlu ve ark., 2001).

Haploid bitkilerin elde edilmesinde ve bu haploid bitkilerden de dihaploid hatların oluşturulmasında, biyoteknolojik yöntemler (anter kültürü, haploid hücre kültürü, somatik doku kültürü), yeni yüksek verimli ve gelişmiş özellikte çeşitler geliştirmek amacıyla klasik ıslah metotlarıyla birleştirilmiştir (Risabell, 1997; Ábel, 2005). Pugliesi ve arkadaşları (1993), 0,2 mg / l BAP ve 0.1 mg / l NAA ile MS (Murashige & Skoog, 1962) tabanlı ortamda melez *H. annuus* × *H. tuberosus* anterlerinden somatik embriyo ve adventif tomurcukları başlatmışlardır. Büyüme düzenleyicilerinden yoksun MS ortamındaki bu embriyonik dokuların uzun süreli kültürleri, somatik embriyolar, sürgün farklılaşması ve bitkilerin toprağa

aktarılması ile sonuçlanmıştır. Ekili ayçiçeği, *in vitro* hücre ve doku kültürü teknikleri gibi biyoteknolojik uygulamalar konusunda oldukça inatçıdır (Gürel ve ark., 1991). Todorova ve ark. (1997), yirmi adet tek ve çok yıllık *Helianthus* türünü incelemişler ve *H. mollis*, *H. salicifolius* ve *H. smithii* türlerinden anter kültürü yoluyla çoğaltmayı başarmışlardır. Aynı zamanda, özellikle diploit türlerde, kallus oluşumunda yüksek oranda varyasyon gözlemlenmiştir. Gürel ve ark., (1991), bir dizi ayçiçeği hattı ve türler arası melezler kullanarak, donör bitki aşamaları, kültür ortamı ve koşulları ve sürgünlerin başarılı rejenerasyonu için farklı kültür parametrelerini test etmişler ve sonuçta ayçiçeğinin anter kültürüne yanıtında, fiziksel, besinsel, fizyolojik ve genetik faktörlerin oldukça etkili olduğunu ortaya koymuşlardır.

Dihaploid bitkilerin üretimi ve kullanımı klasik ıslah metotlarına göre daha avantajlıdır. Dihaploid bitkilerin ıslah programlarında kullanımı homozigot hatların üretilmesi için gerekli zamanı ve iş gücünü azaltır. Çünkü bu bitkiler her lokus için tamamen homozigot haldedirler. Ayrıca bu bitkilerin kullanımı çekinik haldeki allelerin kendilerini derhal ifade etmelerine izin vererek istenilen genotiplerin hızlı ve kolay bir şekilde seçilmelerine imkân verir. Dihaploid tekniği mutasyon ıslahı, genetik transformasyon, genetik haritalama gibi biyoteknolojik yöntemlerle birlikte kullanılmaya da uygundur ve bu sayede ıslah programlarının etkinlikleri artırılabilir (Friedt, 2005). Doğada kendiliğinden haploid bitkiler oluşabilmekteyse de bunların ortaya çıkış frekansı %0.01-0.001 arasında değişmektedir. Doğal haploidlerin ıslah programlarında kullanılması bu nedenle pratik bir değer taşımamaktadır.

DH teknolojisi, tahıl ıslah programlarının hızlandırılmasında kullanılabilen homozigot hatların geliştirilmesi için etkin bir metottur. DH protokolleri üzerinden, buğday (*Triticum aestivum* L.), arpa (*Hordeum vulgare* L.), triticale (*Triticosecale wittm.*), pirinç (*Oryza sativa* L.), *Brassica* spp., patlıcan (*Solanum melongena* L.), biber (*Capsicum annuum* L.), kuşkonmaz (*Asparagus officinalis* L.), çilek (*Fragaria x ananassa* Duch) ve tütün (*Nicotiana tabacum* L.) gibi birçok bitkiler için ticari çeşitlerin geliştirildiği bildirilmiştir (Thomas ve ark., 2003). Kolza, arpa, patlıcan (Veilleux, 1994) ve karpuz, lahanagiller (Cao ve ark., 1995) 'de androgenetik dihaploidler, çeşitli ıslah programlarında çeşit geliştirmek için yaygın olarak kullanılmıştır.

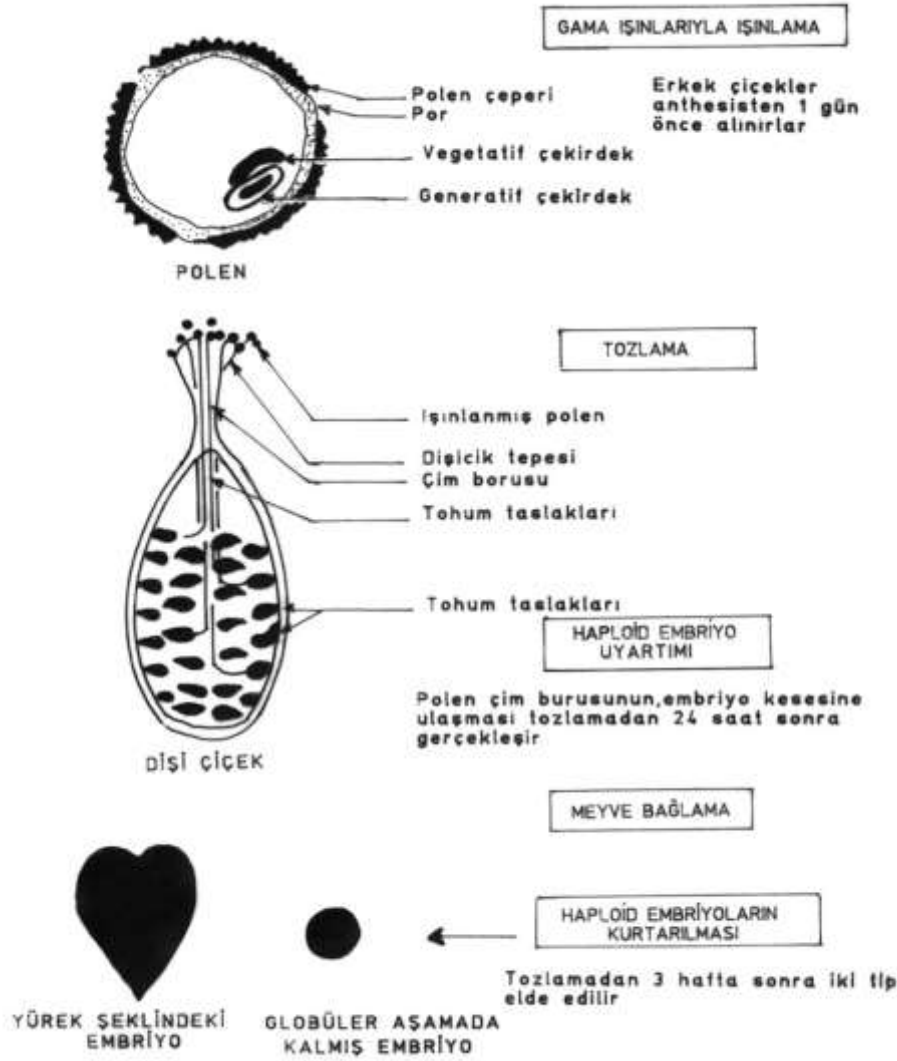
Birçok bitki türünde dişi gametlerin *in vitro* kültüre alınmasıyla yalnızca düşük frekansta haploid embriyoların oluşabileceği sonucuna varılmıştır. Bu sebeple, haploidlerin elde edilme oranını yükseltecek çalışmalar gündeme gelmiştir. Bu gelişmeye bağlı olarak, 1965 yılından sonra eksik ya da yetersiz polenler kullanılarak embriyo oluşturma ve bu embriyoları bitkiye dönüştürme çalışmaları başlamıştır.

Partenogenetik embriyo oluşumunu uyarmak üzere kullanılacak eksik veya yetersiz polenleri elde etmek için, değişik kimyasal maddeler ile radyoaktif ışın uygulamalarından

yararlanılmaktadır. Ayrıca, uzak akrabalar arası melezlemeler, tozlamaların geciktirilmesi, sıcaklık şokları da uygulanan diğer tekniklerdir. Polenlere yapılan bu uygulamalar sayesinde polen generatif çekirdeği inaktif hale getirilmekte, bununla birlikte çimlenme yeteneğini koruyan polenler dışıık tepesi üzerinde çimlendiklerinde oluşturdıkları uyartım sonucunda, partenogenetik olarak haploid embriyolar meydana gelmektedir.

Tozlamada kullanılacak aktif olmayan polenler, farklı kimyasallar aracılığıyla da elde edilebilmektedir. Bu amaç için kolşisin ve tolidin mavisi en fazla kullanılan maddelerdir (Sarı ve ark., 1995; Kurtar, 1999).

1980'li yıllarda polen ışınlaması ve ışınlanmış polenlerle dışı çiçeklerin tozlanması yöntemleriyle haploid embriyoların meydana getirilmesi çalışmaları başlamış ve bu yöntemle birçok bitki türünde başarılı olunmuştur. Işınlanmış polenlerle yapılan tozlama yoluyla partenogenetik embriyo uyartımı, başta *Cucurbitaceae* familyasına ait türler olmak üzere, şeker pancarı, çilek, kivi, petunya, havuç ve lahana gibi bitki türlerinde başarılı sonuçlar vermiştir. Polen ışınlaması sonucu embriyo elde ettikten sonra bu embriyoların bitkiye dönüştürülmesi gerekmektedir (Sarı ve ark., 1992b). Normal bir dölleme sonucunda oluşmayan embriyo endospermden yoksundur, bu nedenle embriyonun kurtarılmasını sağlamak amacıyla haploid embriyoların embriyo kültürüne alınması gerekmektedir. Embriyo kültürüne alınan embriyoların gelişimi birkaç günde tamamlanmaktadır. Ancak bu yöntem düşük oranda haploid bitki eldesi sağladığı için ıslahçılar tarafından tercih edilmemektedir (Ferrie ve ark., 2011).



Şekil 2.4. Işınlanmış polen ile haploid embriyo uyartımının aşamaları (Cuny, 1992).

Elde edilen haploid ve dihaploid ayçiçeği hatlarının çekirdek DNA içerikleri ve dolayısıyla ploidi seviyeleri flow sitometri yöntemi ile belirlenmiştir. Çekirdek DNA miktarı hem bir bitkinin hücreleri arasında, hem de aynı türün farklı bireyleri arasında değişmeden sabit kalmakta ve bu nedenle türlere özel olmaktadır (Bennett ve Leitch, 1995). Türler arasında ise çekirdek DNA içeriği bakımından önemli düzeyde (yaklaşık 1000 kat) farklılıklar gözlenmektedir (Cavalier-Smith 1985). Bu nedenle, çekirdek DNA içeriği bilgisi taksonomik ve evrim çalışmaları için son derece yararlıdır (Rees ve Walters, 1965; Price ve Bachmann 1975; Ohri 1998; Tuna ve ark., 2001; Budak ve ark., 2004). Otuz beş yıl önce, ilk bitki materyalindeki flow sitometri çalışmaları baklanın nükleer DNA içeriğinin analizi (Heller, 1973) ile başlamış ve bu tarihten itibaren de bitki bilimi ve endüstrisinde bu yöntemin geliştirilmesinde ve uygulanmasında giderek bir artış görülmüştür. Daha sonra ayçiçeği bitkisinde de çekirdek

DNA içeriğindeki değişimlerin flow sitometri ile analiz edildiği çalışmalar da mevcuttur (Sims ve Price, 1985; Michaelson ve ark., 1991b). Flow sitometrinin, hem hücre hem de hücre içi partiküllerinin analizi için çok sayıda parametreyi hızlı, aynı anda ve nicel olarak ölçerek uygun bir istatistiksel veriye dönüştürmesi ve de alt populasyonların doğru ve kolay bir şekilde tanımlanmasını sağlaması bu yöntemi ideal bir yöntem yapmıştır (Dolezel ve ark., 2007).

Ayçiçeği bitkisinin verimini olumsuz etkileyen orobanş paraziti ile kimyasal mücadele IMI ve SU grubu herbisitler ile mümkündür (TÜGEYP, 2008). Ancak, herbisitlerin uygulanması esnasında veya sonrasında kültür bitkilerinde çeşitli üretim sorunları da herbisit kullanımının artışına paralel olarak artmıştır. Kültür bitkisi bazında bu sorunlar direkt kültür bitkisinde fitotoksite şeklinde, toprağa uygulanan bazı herbisitlerin bir sonraki ürüne zarar vermesi şeklinde, ürünlerde kalıntı, çevre kirliliği, aşırı kullanılmasından dolayı kültür bitkisinin gelişiminde zayıflama ve verim kaybı şeklinde ortaya çıkmaktadır (Torun, 2011). SU grubu herbisitlerden Sulfosulfuron'un topraktaki kalıcılığı ile ilgili birçok kapsamlı çalışma yapılmıştır. Münavebe bitkisi olarak yetiştirilen *Sorghum bicolor* L. ve *Helianthus annuus* L.'da Sulfosulfuron uygulandığı bir çalışmada, herbisit uygulamasından 17 ay sonra kalıntıların bitkilere zarar verebildiği, başka bir çalışmada ise herbisit uygulamasından 7 - 9 ay sonra topraktaki herbisit kalıntısından dolayı parçalı kamış ve ayçiçeğinde biyolojik kütlenin %99'a varan oranda azaldığı bildirilmiştir (Geier ve Stahlman, 2001; Kelly ve Pepper 2003). Son yıllarda ayçiçeğinde herbisitlere dayanıklılık sağlayarak yabancı ot kontrolünün etkin bir şekilde yapılması ve herbisitlerle orobanş zararının en aza indirilmesi amacıyla değişik ıslah çalışmaları yürütülmüştür. Ayçiçeğinde IMI herbisit grubuna dayanıklılığın yabani ayçiçeği bitkilerinde belirlenmesi ve bu genlerin geri melezlemeyle kültür çeşitlerine aktarılması ile herbisitlere dayanıklı ayçiçeği çeşitleri geliştirilmiştir. IMI grubu herbisitlere dayanıklı ayçiçeği çeşitlerinin kullanılmasıyla, başta ayçiçeğinde büyük verim azalmalarına neden olan orobanş olmak üzere birçok yabancı ot kontrol altına alınabilmektedir (Kaya, 2004). Herbisite dayanıklı bu çeşitler ayçiçeği verimini, dolayısıyla üretimi artıracak önemli bir ıslah çalışması olarak görülmektedir ve önerilen bu projenin ana konusunu oluşturmaktadır. Miller ve Al-Khatib (2000), ayçiçeğinde IMI herbisitlerine olan dayanıklılığın en az iki gen tarafından belirlenen eklemeli genler tarafından kontrol edildiğini ve her bir allelin dayanıklılığı dereceli olarak arttırdığını belirtmişlerdir. Yapılan araştırmada, geri melezlemelerde bitkilerin her bir generasyonda dayanıklı, intermediate ve hassas olarak üçe ayrıldığını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, IMI herbisitlerine dayanıklı hibritler geliştirmek için, R x S ve S x R hibritlerinde de mevcut olduğunu yani ebeveynlerden en az birinin dayanıklı olmasının yeterli olduğunu, ancak yüksek oranda dayanıklılık elde etmek için, ebeveynlerinin ikisinin de dayanıklı genler içermesinin daha iyi olacağını vurgulamışlardır. Ayrıca bazı belirli genotiplerin diğerlerine nazaran daha yüksek dayanıklılık göstermesinin nedenini, modifier

bir genin dayanıklılığın aşamasını belirlediği şeklinde yorumlamışlardır. Kaya ve ark. (2003c), ayçiçeğinde özellikle yabancı ot ve orobanşı kontrol eden IMI (*Imidazolinone*) herbisit grubuna dayanıklı genler, klasik geriye melezleme yoluyla ve embriyo kültürü uygulanıp generasyon süresi kısaltılarak, yabancı türlerden elde edilip ticari çeşitlere aktarılmış, aynı yıl içerisinde ülkemizde ve dünyada piyasaya sürülmüştür. Malidza ve ark. (2000), yaptıkları bir araştırmada, ayçiçeğindeki IMI grubu (imazethapyr) herbisitine karşı dayanıklılığın yarı dominant bir özellik gösterdiğini ve dayanıklı bitkilerin sadece bu herbisit grubuna dayanıklı olduğunu, çıkış sonrası kullanılan diğer herbisitlerin normal dozlarına dahi hassas olduğunu belirlemişlerdir.

Ayçiçeğinde orobanşa dayanıklılık, "Or" olarak adlandırılan tek bir dominant gen ile belirlenmektedir. Sukno ve ark. (1999), İspanya'da ayçiçeğinde yaptıkları araştırmada, bilinen 5 ırka karşı (A,B,C,D,E,F) olan dayanıklılığın tek bir dominant gen ile kontrol edilmesine rağmen, bunlardan farklı olarak orobanşın yeni ırkına dayanıklılığın eklemeli dominant allelik veya çok sıkı biçimde birlikte hareket eden allelik olmayan genler tarafından belirlendiğini tespit etmişlerdir. Alonso (1996, 1998), İspanya'da da orobanşın bu yeni F ırkının ve yine tüm ırkların mevcut olduğunu, C ve E ırklarının da en fazla yayılış alanlarına sahip olduğunu vurgulamıştır. Pacurianu-Joita ve ark. (1998) yaptıkları araştırmada, yeni çok virulent bir orobanş ırkının var olduğunu belirlemişlerdir. Aynı araştırmacılar, tüm mevcut bu beş ırka dayanıklı olan P-1380 hattını orobanşa dayanıksız hale getiren bu yeni ırkın, parazitin F ırkı olduğunu, Or 5 geni tarafından belirlendiğini bu yeni ırka LC-1093 hattının dayanıklı olduğunu belirtmişlerdir. Yapılan bu araştırma sonucunda orobanşın mevcut tüm ırkları (A,B,C,D,E,F) Romanya'da mevcut olup, D ve E ırklarının ise parazitin en fazla yaygın olduğunu vurgulamışlardır. Martinez ve ark. (2005), ayçiçeğinde orobanşa dayanıklılık üzerine yaptıkları çalışmada, E ırkının baskın tek bir gen çifti tarafından kontrol edildiğini, fakat F ırkının ise iki ayrı lokusta yer alan dominant resesif gen çiftinin etkileşimine bağlı olduğunu, bu sebeple dayanıklı hat x dayanıksız hat arasında yapılan melezlemelerde hassasiyet derecesinin melez kombinasyonuna göre farklılıklar göstereceğini bildirmişlerdir. Trakya Bölgesinde orobanşın yeni ırkları ilk olarak 1994 yılında Malkara Şahin ve Hayrabolu Faraş köylerinde görülmüş ve daha sonra diğer bölgelere sıçramıştır (Kaya 2003b). Orobanş ile bulaşık tarlalarda ayçiçeği tarımı yapılacaksa söz konusu bu parazite karşı dayanıklı tohumluğun ekilmesi en kesin çözümdür. Gerek kamu sektörü ve gerekse özel sektörde tohumculuk yapan kuruluşlarda bu parazite karşı dayanıklı hibrit ayçiçeği çeşitleri geliştirmişlerdir (TÜGEYP, 2008).

Ülkemizde ayçiçeği üretiminde genelde hibrit tohumluklar kullanılmakta olup, hibrit çeşitler, yüksek verim performansı, üstün kalite özellikleri, homojen görünümü, bazı hastalıklara ve orobanşa dayanıklı olmalarından dolayı üreticiler tarafından tercih

edilmektedir. Bu nedenle, ülkemizde ve dünyada ayçiçeğinde ıslah programları genelde, hibrit ıslahına yöneliktir. Bu ıslah programlarında hedef, yüksek tane verimi ve yağ oranı, erkencilik, hastalık ve zararlılara dayanıklılık vb. özelliklere sahip kendilenmiş hatlar geliştirip, bunlarla melez azmanlığından yararlanılarak arzulanan performansa sahip hibritler elde etmektir (Kaya ve ark., 2009). Türkiye’de bugün ayçiçeği ıslahı üzerinde çalışan pek çok özel ve kamu kuruluşları bulunmaktadır. Kamu kuruluşları arasında Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü Türkiye’de ayçiçeği ıslahı üzerine görevlendirilmiştir. Bu enstitüde ayçiçeği ıslah çalışmaları 1970 yılından beri yoğun olarak devam etmektedir. Enstitüde yapılan çalışmalar gerek hibrit ıslahı yoluyla çeşit geliştirme gerekse agronomi çalışmaları şeklinde sürdürülmektedir. Bu çalışmalar ‘Ülkesel Ayçiçeği Projesi’ şeklinde 1978 yılında uygulamaya sokulmuştur. Sunulan bu proje önerisinde, hibrit ıslahı programı çerçevesinde Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından elde edilen ve farklı dayanıklılık kaynakları (orobanş ve herbisit) içeren 4 farklı kombinasyona ait ayçiçeği bitkilerinin materyal olarak kullanımı ve *in vitro* anter / mikrospor kültürü uygulamalarıyla haploid ve devamında dihaploidizasyon tekniğinden yararlanarak, orobanş ve herbisite (imi veya SU grubu) dayanıklı saf dihaploid (DH) bitkilerin elde edilmesi amaçlanmıştır.

Ülkemizde ayçiçeği bitki doku kültürü sistemlerinin direkt ve indirekt organogenez yoluyla kurulmasına yönelik olarak çalışmalar gerçekleştirilmektedir. Doku kültürünün kısa sürede ve hızlı bir biçimde rejenerasyon yeteneği ortaya koyması araştırmacıları bu yöndeki çalışmalara teşvik etmektedir (Özyiğit, 1998; Elavazhagan ve ark., 2009). FAO ortak orobanş projesi çerçevesinde, Trakya Tarımsal Araştırma Enstitü tarafından yürütülen projede yapılan çalışmalar doğrultusunda, değişik ülkelere ait test edilen ayçiçeği hibrit ve hatları arasında, TTAE’ne ait Arda-2098 ayçiçeği hibridi ve 3 adet CMS hattının (2478-A, 4155-A ve 4156-A) orobanş test bahçesinde saldırı yüzdesi % 6.7 - % 40.0 ve saldırı derecesi 0.3–1.2 arasında değişmiş olup, Romanya ve Bulgaristan’daki orobanş popülasyonlarına dayanıklılık göstermişlerdir. İspanya’da ise TTAE’ne ait test edilen hat ve hibritler, diğerlerine nazaran düşük derece saldırı yüzdesi (% 5.3-18.2) sergilemişler ve 4156-A hattı tamamı ile dayanıklı bulunmuştur. Yine aynı dönemde, Ukrayna’da yapılan laboratuvar orobanş testlerinde Arda-2098 test edilenlerin içinde, en dayanıklı hibrit olmuştur. Bu dönemde yapılan testler sonucunda, hiçbir genotip test edilen tüm yerlerde dayanıklılık göstermemiştir (Kaya ve ark., 2004).

TTAE’de yağlık ayçiçeğinde 2010 yılında verim denemelerinde üstün performans gösteren 2 adet Orobanşa dayanıksız, bir adet orobanşa dayanıklı (05–TR-003) hibrit tescile verilmiştir. Bunlardan orobanşın yeni ırklarına dayanıklı, yüksek tane verimine sahip, 05 TR 003 hibriti tescil denemelerinin ilk yılında, yağ oranında en yüksek standart hibrite % 10 bir üstünlük sağlamış ve bu hibrit 2011 yılında ihaleyle Biotek Tohumculuk şirketine verilmiş ve

2011 yılında üretilerek 2012 yılında çiftçilere dağıtımı yapılacaktır. TTAE de son 10 yılda 6 adet yağlık, iki adet çerezlik olmak üzere toplam 8 adet ayçiçeği hibriti ve birçok ebeveyn hat geliştirmiş, birçok projeyi başarıyla sonuçlandırmış, son beş yılda 60 civarında bilimsel yayın yapmış, ulusal ve uluslararası kuruluşlarla ayçiçeğinde önemli işbirliği çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Yağlık ayçiçeğinde son iki yılda; 2010 yılında ise verim denemelerinde üstün performans gösteren 2 adet Orobanşa dayanıksız, bir adet orobanşa dayanıklı (05–TR-003) tescile verilmiştir. Bunlardan orobanşın yeni ırklarına dayanıklı, yüksek tane verimine sahip, 05 TR 003 hibriti tescil denemelerinin ilk yılında, yağ oranında en yüksek standart hibrite % 10 bir üstünlük sağlamış ve bu hibrit 2011 yılında ihaleyle Biotek Tohumculuk şirketine verilmiş ve 2011 yılında üretilerek 2012 yılında çiftçilere dağıtımı yapılacaktır. Ayrıca Macaristan Szeged Enstitüsüyle iki adet ortak hibrit (Larissa ve İnessa) 2009 yılında Romanya da tescil edilmiş ve üretimine başlanmıştır. Yine yapılan TÜBİTAK ikili işbirliği projesinde geliştirilen 2 adet ortak hibrit, şu anda Romanya da tescil denemelerinde yer almaktadır. Yine bu projeden geliştirilen orta oleik ve orobanşa dayanıklı SARAY hibridine 2011 yılında üretim izin alınmıştır. 2011 yılında ise, 8 adet Ayçiçeği hibritine (5 adet orobanşa dayanıklı ve 3 adet dayanıksız) üretim izini alınarak tescile başvurulmuştur. Bu hibritlerden 3 adedi (2 adet orta oleik ve orobanşa dayanıklı ve 1 adet yüksek oleik) üretim amacıyla Trakya Birliğe devredilmiştir. Bu hibritlerden bir adedi de TEKCAN Tarım şirketiyle ortak hibrittir. Ayrıca Fransız Maisador firmasıyla bir adet ortak çeşit için, İtalya da tescil denemelerine başvurulmuştur.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3. 1. Bitkilerin Yetiştirilmesi

Bu çalışmada, Edirne’de bulunan T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, TAGEM, TTAE tarafından proje öncesinde hazırlanan ve orobanşa dayanıklılık, imi (imidazolinon) ve SU (sulfonururea) grubu herbisitlere dayanıklılık bakımından genetik olarak açılma gösteren ana (CMS) ve baba (restorer) hatlarının melezlenmesi ile geliştirilen farklı kombinasyonlara ait örnekler projemiz kapsamında materyal (**Tablo 3.1.**) olarak kullanılmıştır.

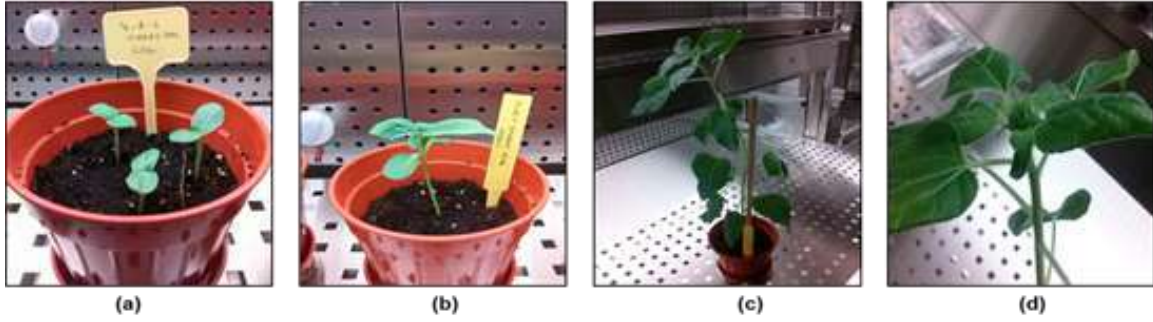
Tablo 3.1. Proje tarla koşullarında kullanılan materyal ve özellikleri.

Projede kullanılan materyal	Özellikleri	Açıklama
IMI-K2-R-SN-7/15	IMI grubu herbisitlere dayanıklı, orobanşa dayanıklı, mildiyö hastalığına dayanıklı restorer materyali	Aynı melez kombinasyonundan gelen restorer ıslah materyalidir ve taşıdıkları dayanıklılık özellikleri aynıdır.
SURES-K2-R-SN-9/15	SU grubu herbisitlere dayanıklı, orobanşa dayanıklı, mildiyö hastalığına dayanıklı restorer hat	Aynı melez kombinasyonundan gelen restorer ıslah materyalidir ve taşıdıkları dayanıklılık özellikleri aynıdır. Materyalin ilerki yıllarda yapılan testlerde mildiyö hastalığına da dayanıklılık özelliği taşıdığı belirlenmiştir.
SURES-K2-AD-SN-2/15	SU grubu ilaçlara dayanıklı, orobanşa dayanıklı, mildiyö hastalığına dayanıklı maintanier (ana) kaynak	Aynı melez kombinasyonundan gelen ana ıslah materyalidir ve taşıdıkları dayanıklılık özellikleri aynıdır.
IMI-K2-R-SN-25/15	IMI grubu herbisitlere dayanıklı, orobanşa dayanıklı, mildiyö hastalığına dayanıklı restorer materyal	Proje önerisinde yer alan materyalin tohumu çok az olduğundan dolayı, aynı materyalin kullanımı mümkün olmamıştır, onun yerine sonradan yine aynı genetik kaynakların melezlenmesiyle elde edilen ve aynı dayanıklılık özellikleri taşıyan IMI-K2-R-SN-25/15 ıslah materyali kullanılacaktır.
IMI-K2-R-SN-22/15	IMI grubu herbisitlere ve orobanşa dayanıklı, restorer materyal.	Haploid bitki elde etme olasılığını arttırmak amacıyla bu kombinasyon sonradan projeye eklenmiştir.
IMI-K2-AD-SN-2/15	IMI grubu herbisitlere ve orobanşa dayanıklı, ana materyal.	Haploid bitki elde etme olasılığını arttırmak amacıyla bu kombinasyon sonradan projeye eklenmiştir.

Projemizin nihayi hedefi ayçiçeğinde (*Helianthus annuus* L.) **orobanş** ve **herbisite dayanıklı** dihaploid hatların ***in vitro* koşullarda** geliştirilmesidir.

Sözkonusu *in vitro* çalışmalar kapsamında projemizde Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü (TTAE)'den temin edilen tohumlar, anter ve mikrospor kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere Marmara Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü altyapısında mevcut bulunan bitki yetiştirme odasında 25 ± 2 oC'de ve 16/8 saat aydınlık/karanlık fotoperiyodunda tutularak çimlendirildiler. Yaklaşık olarak iki ay sonunda henüz açmamış olan ve gelişimlerinin tek nukleuslu safhasındaki mikrosporları içeren uygun büyüklükteki çiçek tomurcuklarından (kapitulumlardan) izole edilen anter ve mikrosporlar *in vitro* koşullarda haploid bitki eldesi çalışmalarında başlangıç materyali olarak kullanıldılar.

Bitki yetiştirme odasında her bir çeşit için her saksıda 3'er adet tohum olacak şekilde ekim yapılmış (**Şekil 3.1a.**), çimlenmeyi takiben bitkiler ayrı ayrı saksılara alınarak (**Şekil 3.1b.**) yaklaşık olarak iki ay sonunda çiçeklenmenin başladığı, 65-70 günlük bitkilerde uygun tomurcuk büyüklüğü tespit edilmiştir (**Şekil 3.1c,d.**). Bu süreçte tüm örneklerle, bitki yetiştirme odasında 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık fotoperiyodu uygulandı (**Şekil 3.2.**).



Şekil 3.1. Donör bitkilerin çimlenme ve gelişme safhaları.



Şekil 3.2. Bitki yetiştirme odasında yetiştirilen farklı kombinasyonlara ait 2-3 haftalık fideler.

Projemizde bitki yetiştirme odasında büyütülen bitkilerde gelişen kapitulumlardan elde edilen uygun evredeki anterlerin az sayıda ve beklenen kalitede olmaması, bu anterlerden izole edilen mikrosporda hedeflenen yoğunluğa ulaşılamaması gibi nedenlerden dolayı

danışmanlarımızın da önerisi ile projemizde başlangıç materyali olan kapitulumların bitki yetiştirme odasında değil de tarla koşullarında elde edilmesinin uygun olacağına karar verilmiştir.

Henüz açmamış olan kapitulumların elde edilmesi amacıyla bitki materyali 20'şer bitki olacak şekilde sıra halinde ve 15 gün aralıklarla üç farklı ekim zamanında ekilmiştir (**Şekil 3.3.**).



Şekil 3.3. Proje materyali Edirne’de TTAE arazisinde ve kuru şartlarda yetiştirilmiştir (2016 yılında çekilen fotoğraf).



Şekil 3.3.'ün devamı. Proje materyali Edirne'de TTAE arazisinde ve kuru şartlarda yetiştirilmiştir (2016 yılında çekilen fotoğraf).

Bu şekilde farklı zamanlarda henüz açmamış olan kapitulümlar elde edilmiştir (**Şekil 3.4A, B**).



Şekil 3.4A-B. TTAE arazisinde yetiştirilen farklı kombinasyonlara ait bitkiler (A) ve kapitulümları (B).

3. 2. Haploid Bitkilerin Elde Edilmesi

3. 2.1. Anter Kültürü ile Haploid Bitkilerin Elde Edilmesi

3.2.1.1. Kapitulüm büyüklüğünün ve mikrospor gelişim aşamasının belirlenmesi

Anter ve mikrospor kültürü çalışmaları için çiçekler açmadan hemen önce, yaklaşık olarak uygun boyuttaki kapitulümlar hasat edilerek yine uygun koşullarda (**Şekil 3.5.**) Marmara

Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Bitki Biyoteknolojisi laboratuvarına transfer edildi.

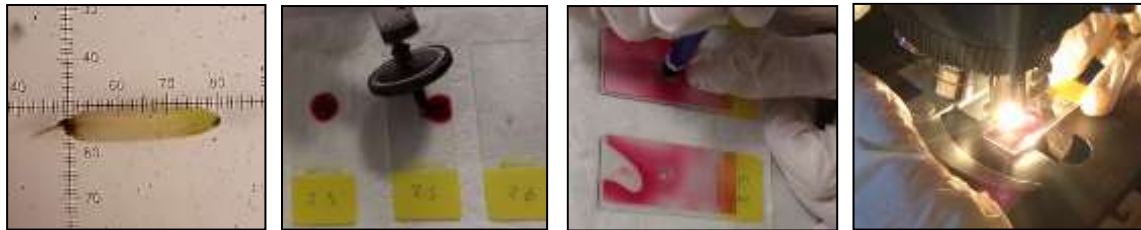


Şekil 3.5. Tarlada yetişen uygun boyuttaki kapitulumların bitkiden ayrılarak doku kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere M. Ü.'ne transferi için hazırlanması.

Bitkilerde genel olarak morfolojik dönem ile mikrospor gelişme dönemi arasındaki ilişkinin belirlenerek kültüre alınacak tomurcukların seçilebilmesi için asetoorsein yöntemi sıklıkla kullanılabilir. Bu amaçla kültürü yapılacak her çeşitte, morfolojik olarak elverişli dönemlere yakın görülen büyüklükteki tomurcuklar toplanarak mikrospor gelişme dönemleri incelenmiştir. Çiçekler açmadan hemen önce (**Şekil 3. 6.**) ve mikrosporlar gelişimlerinin orta-geç tek nukleuslu safhasındayken kapitulumlar hasat edilerek, ilgili safhanın tespit edilebilmesi için öncül sitolojik çalışmalar yapılmıştır.

Ezme preperat yöntemi;

Binoküler mikroskop altında kapitulumdan alınan farklı boyutlardaki anterler lamlara yerleştirilerek üzerlerine %2'lik aseto orsein çözeltisi damlatıldı ve üzeri lamel ile kapatılıp sert bir cisim yardımıyla ezildi. Işık mikroskopu altında incelenerek uygun safhaya ait boyut belirlenip referans olarak seçildi (**Şekil 3. 7.**).



Şekil 3.6. Mikrospor evresindeki çiçekçik boyutunun belirlenmesi: (A) binoküler mikroskopta çiçekçik boyutunun ölçülmesi (B) lam üzerine alınan çiçekçikler üzerine aseto-orsein damlatılması (C) çiçekçiklerin ezilmesi (D) orta-geç tek nukleuslu evredeki mikrosporların ışık mikroskopunda görüntülenmesi.

Aseto-orsein solusyonunun hazırlanması;

%2'lik 100 ml'lik aseto orsein çözeltisi hazırlamak için 2 gr orsein tartılıp üzerine kaynatılan 45 ml asetik-asit döküldü, çözelti distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Boya tamamen çözülünceye kadar manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Çözelti karanlık ortamda saklandı.

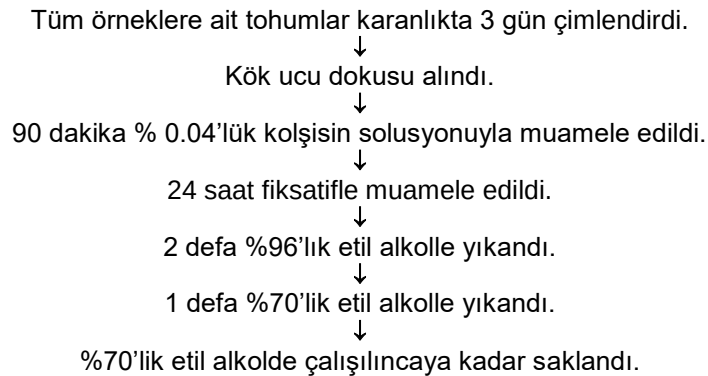
Bitki büyüme odasında yetiştirilerek elde edilen kapitulumlara benzer şekilde tarlada yetiştirilen materyalde de kapitulum büyüklüğünün ve mikrospor gelişim aşamasının belirlenmesi çalışmaları gerçekleştirildi.

Bu amaçla tüm örneklerde farklı gelişim evrelerindeki anterleri içeren çiçek tablaları asetik asit:alkolde (1:3 v/v) 24 saat fikse edildi. Fikse edilmiş çiçek tablaları 2 kez %96 alkolde 2 kez %70 alkolde yıkandıktan sonra %70 alkolde +4°C'de saklandı. Daha sonra çiçek tablaları dokudaki fazla alkolün alınması için yükselen alkol seviyelerinden geçirilerek dehidre edildiler. Gömme maddesi olan parafinin infiltrasyonu için ise ksilol serilerinden geçirildiler. Parafine gömülen materyalden 10-12 µm kalınlığında enine kesitler alındı. Albümin mayer sürülmüş lamlarda 1 gece bekletilen kesitlerden parafinin kaldırılması için ksilol-alkol serilerinden geçirilerek suya kadar getirildiler. Genel anter yapısının belirlenmesi için kesitlere standart hematoksilen boyaması uygulandı (Vardar, 2013). Anterlerdeki nişasta gibi çözünmeyen polisakkaritler ve proteinlerin belirlenmesi için ise Periyodik asit-Schiff (PAS) ve Coomassie parlak mavisi boyamaları uygulandı (Feder ve O'Brien, 1968; Fisher 1968). Boyama işlemlerinden sonra kesitler entellan yardımı ile kapatılarak, Olympus BX-51 mikroskobunda incelendi, Kameram dijital fotoğraf makinesi ile fotoğraflanıp, Kameram yazılım programında analiz edildi.

Çalışmada hibrit genotipler kullanıldığı için başlangıç materyalinin ploidi kontrolü amacıyla doku kültürü çalışmalarına başlamadan önce ayrıca kromozom analizleri de gerçekleştirildi.

Kromozom Analizleri

Başlangıç materyali olarak kullanılan hem bitki büyüme odasında hem de tarlada yetiştirilen materyalde kromozom analizleri gerçekleştirildi. Bitki büyüme odasında yetiştirilen materyalin petri kaplarında çimlendirilen tohumlarına ait kök ucu dokularının fiksasyonu aşağıdaki adımlar takip edilerek gerçekleştirildi.



Fiksasyon işlemini takiben kök ucu dokuları Karnoy çözeltisiyle muamele edildikten sonra ezme preparatlar hazırlandı (Teresa ve ark., 1996). Olympus BH-2 ışık mikroskopunda x100 objektifi ile incelenen dokular Image Pro-express programı ve Evolution LC Color kamera ile fotoğraflandı.

Tarla örneklerinde, her kombinasyona ait ayçiçeği tohumları %1'lik ticari çamaşır suyunda 10 dakika steril edildiler. Daha sonra tohumlar şişmeleri için 1 saat distile suda şişirildiler. Suda şişirilmiş tohumlar distile su ile nemlendirilmiş filtre kâğıtları bulunan petri kaplarında çimlendirilmeye bırakıldılar. Petri kaplarındaki nemli filtre kâğıtları her gün yenisi ile değiştirildi. IMI grubu tohumlar daha çabuk çimlenirken, SURES grubu tohumların çimlenme yüzdelerinin oldukça düşük olduğu, ayrıca sağlıklı kök oluşmadığı gözlemlendi. 5 gün sonunda çimlenmiş tohumlara ait köklerden yaklaşık 1'er cm kesildi. Farklı genotiplere ait ayçiçeği köklerinden karyotip elde etmek amacıyla köklere farklı ön muameleler uygulandı. Kromozomların en net ve kısa-kalın hallerinin belirlenebilmesi için **Tablo 3.2'**de yer alan 3 farklı ön muamele yöntemi uygulandı. Uygulanan bu metotlardan α -bromonaftalen ve buzlu su kromozomların dağılmayarak yapışkan yığınlar halinde gözlenmesine sebep oldu. Ancak Cuellar ve ark. (1996)'a göre uygulanan %0,04 Kolhisin ön muamelesinin ayçiçeğinde ezme preparat ve karyotip çalışmalarına uygun kromozom görüntüleri verdiği belirlendi.

Tablo 3.2. Ayçiçeği köklerinden karyotip elde etmek amacıyla uygulanan ön muamele yöntemleri.

Ön Muamele	Uygulama süresi	Kaynak
α -bromonaftalen	24 saat (+4°C)	Özhatay N, Koçyiğit M ve Akalın-Uruşak E (2012). One more <i>Allium</i> species for the Turkish flora: <i>A. saxatile</i> . Turkish Journal of Botany 36:644-649.
Buzlu su	24 saat	Singh RJ (2002). Plant Cytogenet. CRC Press, USA.
%0,04 Kolhisin	90 dakika (oda sıcaklığı)	Cuellar T, Belhassen E, Fernández-Calvín B, Orellana J ve Bella JL (1996). Chromosomal differentiation in <i>H. annuus</i> var. <i>macrocarpus</i> : heterochromatin characterization and rDNA location. Heredity 76, 586–591.

Ön muamele sonrasında ise kökler asetik asit:alkolde (1:3 v/v) 24 saat fikse edildi. Fikse edilmiş kökler 2 kez %96 alkolde 2 kez %70 alkolde yıkandıktan sonra %70 alkolde +4°C'de saklandı. Cuellar ve arkadaşlarına (1996) göre kökler sitrat tamponunda hazırlanmış

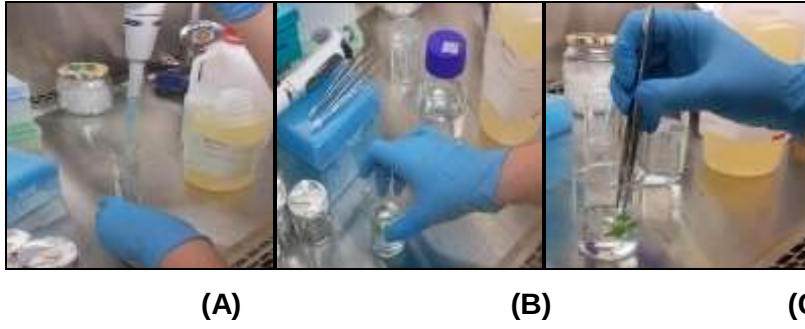
(pH 4.2) %0,5'lik pektinazda 37°C'de ısıtma tablasında literatürden farklı olarak 1 saat yerine 30 dakika bekletmek yeterli oldu. Daha sonra kökler 1N HCl'de 60 °C'de 10 dakika bekletildiler. HCl ile hidroliz sonrasında **Tablo 3.3'**de belirtildiği gibi farklı kromozom boyar maddelerinin kullanıldığı Feulgen reaksiyonu gerçekleştirildi. Kökler bazik fuksin ile boyandığında arka planda kalan boya artığı ve kromozomların iyi boyanmaması sebebiyle Schiff reaktifi tercih edildi. Schiff reaktifinde boyanan kökler %0.5'lik Na₂SO₅ çözeltisinde çalkalandılar. Köklerin ucundaki boyanmış kısım skalpel yardımıyla kesilerek 1 damla aseto-orsein içerisinde lam-lamel arasında iyice ezilerek dağıtıldılar. Ezme preparatlar Olympus BX-51 mikroskobunda incelendi, Kameram dijital fotoğraf makinesi ile fotoğraflanıp, Kameram yazılım programında analiz edildi.

Tablo 3.3. Farklı kromozom boyar maddelerin kullanıldığı Feulgen reaksiyonları ve uygulama koşulları.

Boyar madde	Uygulama koşulları	Kaynak
Bazik Fuksin	1.5-2 saat karanlıkta oda sıcaklığında kökler bazik fuksinde bekletildiler. Daha sonra %2'lik aseto-orsein de ezildiler.	Ünal M, Ünsal NP ve İsmailoğlu I. (2005). The Effect Of Putrescine And Difluoromethylornithine On Cell Division Activity Of Wheat In Different Ploidy Level. Caryologia 58: 15-20.
Schiff reaktifi	30 karanlıkta oda sıcaklığında kökler Schiff reaktifinde bekletildiler. Daha sonra %0.5 sodyum metabisüfit çözeltisinde çalkalanan kökler %2'lik aseto-orsein de ezildiler.	Özhatay N, Koçyiğit M ve Akalın-Uruşak E (2012). One more <i>Allium</i> species for the Turkish flora: <i>Allium saxatile</i> . Turkish Journal of Botany 36:644-649.

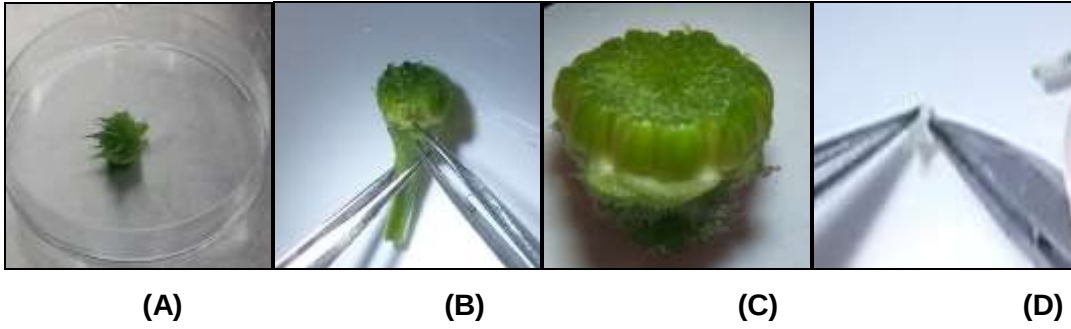
3. 2.1.2. Kapitulumların Yüzey Sterilizasyonu ve Anter İzolasyonu

Uygun safhada olan kapitulumların yüzey sterilizasyonu yapıldı. Sterilizasyon esnasında kapsüller %3'lük Tween-20 solüsyonunda beş dakika boyunca çalkalandı daha sonra %1 oranında sodyum hipoklorit içeren solüsyonda 15 dakika boyunca çalkalandı. Çalkalama işleminin ardından kapitulumlar üç defa beşer dakikalık periyotlarla steril distile su ile yıkandı (**Şekil 3.7.**).



Şekil 3.7. Kapitulum yüzey sterilizasyonu aşamaları (a) kapitulumların tween-20 ile muamelesi (b) kapitulumların sodyum hipokloritte çalkalanması (c) kapitulumların suyla yıkanması.

Steril edilen kapitulumlar stereo mikroskop altında eksternal yapraklardan arındırılarak açıldı, uygun boyutta henüz sararmamış, yeşil-beyaz renkteki çiçek tomurcukları seçilip bistüri ve pens yardımıyla kesildi. Stamenler çıkartılıp anterler besin ortamına ekildi (**Şekil 3.8.**).



Şekil 3.8. Anter izolasyon basamakları (a) Uygun safhada mikrospor içeren kapitulum (b) kapitulumun dış yapraklarının ayıklanması (c) uygun çiçekçiklerin belirlenmesi (d) anter izolasyonun yapılması.

3. 2.1.3. Anter kültürü başlangıç ortamlarının hazırlanması ve inkübasyonu

Bitki Yetiştirme Odası Koşulları

In vitro anter kültürü çalışmaları bitki yetiştirme odasında büyütülen ve öneride sunulan (SURE-K0-AD-SN-1/13 ve IMI-K3-R-SN-8/13) örnekler ile ilave çalışılan (SURE K5-R-SN-4/13 ve IMI-K0-R-SN-7/13) örneklerin elde edilen kapitulumlardan izole edilen anterlerin kullanımı ile gerçekleştirildi.

Stok Solusyonların Hazırlanması ;

Stok Hormon Çözeltisi Hazırlama; 1mg/ml konsantrasyonunda stok hormon çözeltisi hazırlanırken, 100 mg hormon tartılıp 5 ml uygun çözücü (NaOH, EtOH, su) ile çözüldü, çözelti didistile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti steril kabin içerisinde filtreden geçirilip tüplere dağıtıldı. Stok bitki büyüme düzenleyicilerine ait çözeltiler kullanılıncaya kadar -20 0C'de saklandı.

Besin ortamı hazırlığı ve sterilizasyonu;

Bu çalışmada yarı katı MS (Murashige ve Skoog 1962) temel besin ortamı (**Tablo 3.4.**) kullanıldı. Bu besin ortamının seçilmesinin sebebi literatürde ayçiçeği anter kültürü çalışmalarında yarı katı MS besin ortamının sıklıkla kullanılmasıdır (Thengane vd, 1994; Saji ve Sujatha, 1998; Vijaya Priya vd, 2003). MS besin ortamı çözeltisine sükröz (30 g/l) ve fitajel (2.2 g/l) eklendikten sonra ortamın pH'si NaOH ve HCl kullanılarak 5.8'e ayarlandı ve daha sonra besin ortamları 1 atmosfer basınçta ve 121 °C'de 20 dk. süre ile otoklavlandı. Sterilizasyonu tamamlanan besin ortamları farklı kombinasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri ile desteklendi.

Bitki büyüme düzenleyicilerinin 3 farklı kombinasyonu (**Tablo 3.5.**) şeklinde hazırlanan MS temel besin ortamlarına izole edilen anterler aktarıldı. Petrilere 25 ml besin ortamı döküldü. Her kombinasyon için 32, toplamda 96 (32×3 kombinasyon) petriye besin ortamı döküldü. Her petriye ortalama 10 adet anter ekilip petrilerin etrafı parafilm ile sarıldı. Anter aktarılmış petrilerin ağırlık ölçümleri yapıp her alt kültürleme öncesinde ağırlık değişimleri saptandı.

Tablo 3.4. Çalışmada kullanılan yarı katı MS temel besin ortamına ait makro-mikro elementler ile vitamin ve karbonhidrat kaynaklarına ait miktarlar.

Makro Elementler	mg/l
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Mikro Elementler	
KI	0.83
H ₃ BO ₃	6.20
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,08
Na ₂ EDTA	37.3
Vitaminler	
Pyrodoxine HCl	0.5
Glycine	2.0
Nicotinic Acid	0.5
Thiamine-HCl	0.1
Myo-inositol	100
Karbonhidratlar	
Sükröz	30.000

Tablo 3.5. Başlangıç besin ortamı kombinasyonları.

BESİN ORTAMI KODU	BA (mg/L)	NAA (mg/L)	2.4D (mg/L)	IAA (mg/L)
A1-MS	0,5	0,5	-	-
A2-MS	0,5	-	0,5	-
A3-MS	0,5	-	-	0,5

Organ ve embriyo oluşturmak üzere rejenerasyon ortamına aktarılan kalluslar ve inkübasyon koşulları

Başlangıç kültüründe karanlıkta bir ay tutulan kültürler daha sonrasında rejenerasyon besin ortamlarına (**Tablo 3.6.**) alındı. Bu besin ortamı hazırlanırken MS temel yarı katı besin ortamı içeriği kullanıldı. Farklı bitki büyüme düzenleyicilerle desteklenen kültürlerden fizyolojik olarak en iyi sonuç veren R1-MS (MS+ 0.1 mg/L Kinetin) ortamı olduğu saptandı ve çalışmanın devamında besin ortamı 0,1 kinetin (mg/l) bitki büyüme düzenleyicisi ile desteklendi. Rejenerasyon ortamına alınan kütürler 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık fotoperiyodunda tutuldu ve ayda bir alt kültürlemeler yapıldı.

Tablo 3.6. Rejenerasyon besin ortamı kombinasyonları.

BESİN ORTAMI KODU	BA (mg/L)	NAA (mg/L)	TDZ (mg/L)	KİNETİN (mg/L)
R1-MS	-	-	-	0.1
R2-MS	0,5	-	-	-
R3-MS	0,5	-	-	0,5
R4-MS	-	0,5	-	1
R5-MS	-	-	0.1	-

Denemelerde 4 farklı genotip, 3 farklı soğuk ön uygulama, 4 farklı sıcak uygulama ve kontrol grupları (**Tablo 3.7.**) kullanıldı. Başlangıç besin ortamına alınan anterler 1 ay boyunca karanlıkta inkübe edildi. Petriye ekilen anter sayısı, oluşan kallus sayısı, embriyojenik olan ve embriyojenik olmayan kallus sayıları kaydedildi.

Tablo 3.7. Anter kültüründe kullanılan genotipler, uygulama çeşitleri ve bitki büyüme düzenleyicileri kombinasyonları. (Kontrol: hem soğuk hem sıcak uygulama için aynı kontrol serisi kullanılmıştır).

Materyal	Soğuk Ön Uygulama	Sıcak Uygulama	Besin Ortamı Kodu
G1: İMİ-K0-R-SN-7/13 G2: İMİ-K3-R-SN-8/13 G3: SURES K5-R-SN-4/13 G4: SURES-K0-AD-SN-1/13	Kontrol	2 gün 35 °C	Kontrol
			A1
			A2
			A3
			R1
	24 saat +4 °C	4 gün 35 °C	Kontrol
			A1
			A2
			A3
			R1
	48 saat +4 °C	8 gün 35 °C	Kontrol
			A1
			A2
			A3
			R1
	72 saat +4 °C	12 gün 35 °C	Kontrol
			A1
			A2
			A3
			R1

Tarla Koşulları

Kapitulum ve çiçekçik boyutları belirlenen tarla örneklerinin yüzey sterilizasyonu gerçekleştirildikten sonra 6 farklı genotip, 3 farklı soğuk ön uygulama, 4 farklı sıcak ön uygulama ve kontrol grupları kullanıldı (**Tablo 3.8.**).

Tablo 3.8. Anter kültüründe kullanılan genotipler, uygulama çeşitleri (*Kontrol: hem soğuk hem sıcak uygulama için aynı kontrol serisi kullanılmıştır).

Bitki Materyali	Soğuk Ön Uygulama	Sıcak Ön Uygulama
G1 (İMİ-K2-R-SN-7/15)	24 saat +4 °C	2 gün 35 °C
G2 (İMİ-K2-R-SN-22/15)		
G3 (İMİ-K2-AD-SN-2/15)	48 saat +4 °C	4 gün 35 °C
G4 (İMİ-K2-R-SN-25/15)	72 saat +4 °C	8 gün 35 °C
G5 (SURES K2-R-SN-9/15)		
G6 (SURES-K2-AD-SN-2/15)		12 gün 35 °C

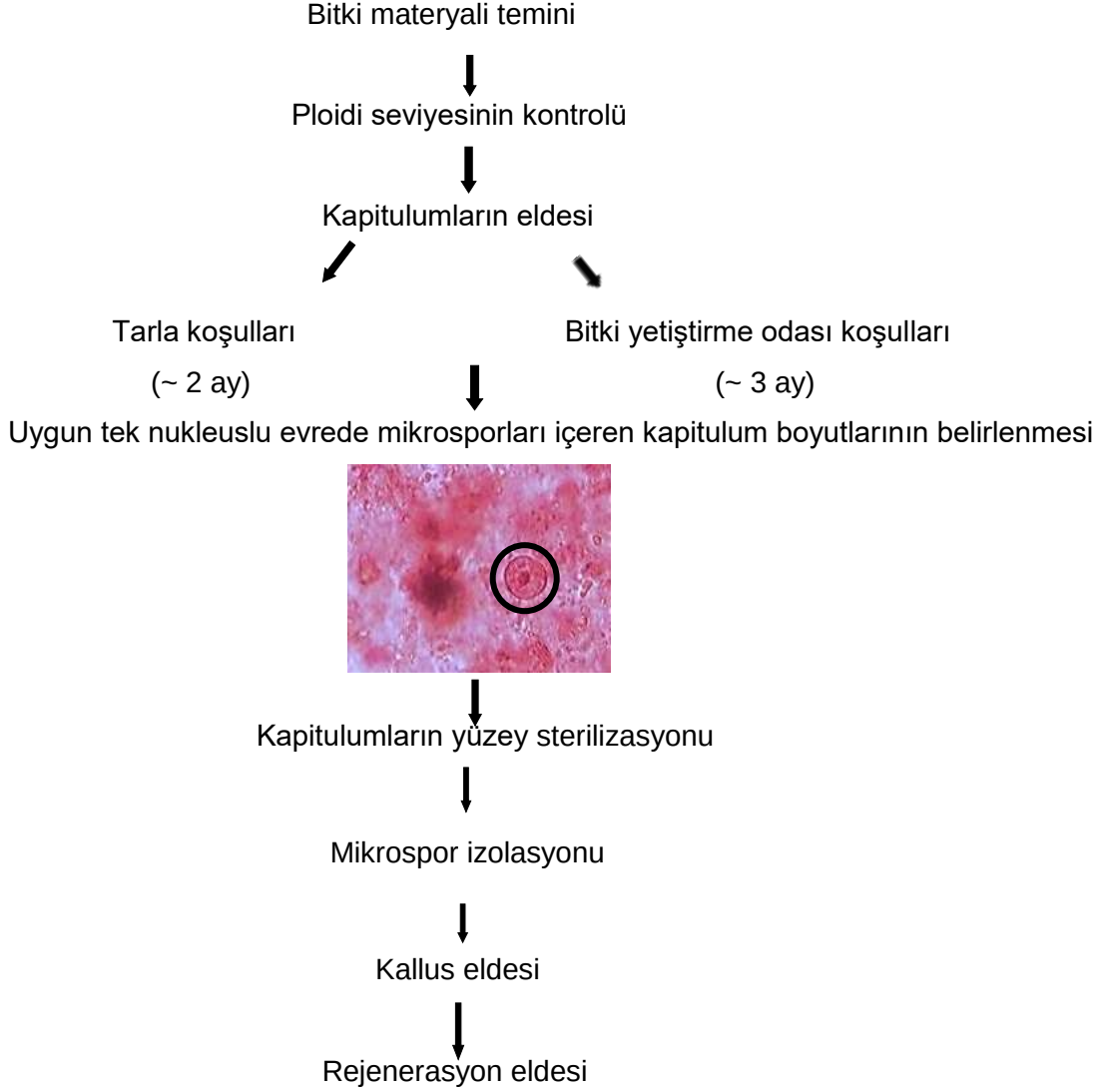
Uygun evredeki mikrosporları içeren anterler **Tablo 3.9.**'da verilen bitki büyüme düzenleyicilerinin 5 farklı kombinasyonu şeklinde hazırlanan MS temel besin ortamlarına ekildiler. Yapılan ilk denemelerde A5 besin ortamında verim sağlanamayınca besin ortamlarına A1, A2, A3 ve A4 olarak devam edildi. Başlangıç besin ortamlarında (A1MS-A5MS) karanlıkta bir ay tutulan kültürler daha sonrasında rejenerasyon besin ortamlarına (R1MS-R3MS) (**Tablo 3.9.**) alındı. Bu besin ortamı hazırlanırken MS temel yarı katı besin ortamı içeriği kullanıldı. Farklı bitki büyüme düzenleyicilerle desteklenen kültürlerden fizyolojik olarak en iyi sonuç veren R3-MS (MS+ 0.5 mg/L Kinetin+ 1g/L PVP) ortamı olduğu saptandı ve alt kültürlemelere bu besiyeri ortamıyla devam edildi. Rejenerasyon ortamına alınan kütürler 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık fotoperiyoduna alınarak ayda bir alt kültürlemeler yapıldı.

Tablo 3.9. Başlangıç ve rejenerasyon besin ortamı kombinasyonları.

Besin Ortamı Kodu	BA (mg/L)	NAA (mg/L)	2.4D (mg/L)	IAA (mg/L)	HBr (Homobrassinolid) (mg/L)	Kinetin (mg/L)	PVP (g/L)
A1-MS	0,5	0,5	-	-	-		
A2-MS	0,5	-	0,5	-	-		
A3-MS	0,5	-	-	0,5	-		
A4-MS	1	2	-	-	-		
A5-MS	-	-	-	-	0,5		
R1-MS						0.1	0,001
R2-MS						0,5	0,001
R3-MS						0,5	1

3.2.2. Mikrospor Kültürü ile Haploit Bitkilerin Elde Edilmesi

Elde edilen bu bitki materyalleriyle farklı protokoller uygulanarak gerçekleştirilen mikrospor kültürü çalışmalarında izlenen adımlar **Şekil 3.9**'da verilmiştir.



Şekil 3.9. Mikrospor kültürü çalışmasında izlenen adımlar.

Mikrospor gelişim aşaması belirlenirken mikrospor içeren çiçekçik boyutunun genotipe, ana ve yandallara, iklim koşullarına göre değişiklik gösterdiği saptanmıştır. Bu nedenle çalışmadan önce her kapitulum için mikrospor gelişim aşaması kontrol edilmiştir.

Mikrospor kültürü çalışmalarında şimdiye kadar, aşağıda detayları verilen farklı literatürler takib edilerek gerçekleştirildi.

- I. Todorova, M., Dahlhoff, M., Friedt, W. (1993) Microspore culture in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Biotechnol. Biotechnol. Eq. 7: 83–90.

- Uygun evrede olan kafalar %96lık ethanolde 30 sn ardından NaOCl de 25 dk tutulup distile suyla yıkanarak yüzey steriliasyonu yapılır.
- Uygun evrede mikrosporları içeren çiçekçikler 5ml %12 lik sukroz soluyonu ve 1.9 g/lt ascorbic esit çözeltisine konur.
- Cam bagetle ezilir.
- 22.4 mikometre boyutlu filtreden geçilir.
- Santrifuj tüplerine alınır.
- İçerisinde 3ml sukroz solusyonu ve vitC içeren solusyon eklenir.
- Süspansiyon 750 rpm 10dk santrifüj edilir
- Pellet 6 ml kültür solusyonuyla tekrar çözülür ve santrifüj işlemi 2 defa tekrar edilir.
- Son santrifüjün ardından pelletteki ml başın düşen mikrospor miktarı saptanır, ml başına 6×10^4 mikrospor olmalıdır.
- Sıvı besi yerine alınır.
- 30 °C de karanlıkta inkübe edilir.
- 3. Gününde Charcoal içeren besi yerinden Charcoalsız besi yerine geçilir.
- 2 gün de bir taze besi yeri eklenir.

1) Uygun boyuttaki çiçekçikler behere alınır.



2) 5 ml %12'lik sukroz+ 1.9 g/l askorbik asit çözeltisinde cam baget ile ezilir.



- 3) Bu işlemten sonra 20 µm'lik filtreden geçirilir.



- 4) Örnekler falkon tüplere alınır.



- 5) Sonrasında 3 ml %12'lik sukroz+1.9 g/l askorbik asit çözeltisi eklenir ve 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir. Supernatant dökülür ve pellet 6 ml besiyerinde çözülür. Bu çözelti Charcoal içeren katı besiyerine ekilir.



- 6) Petriler alüminyum folyoya sarılır ve 30 °C 'deki etüvde 3 gün boyunca bekletilir. Bu 3 günden sonra 2 günde bir besiyerlerine 2 ml kültür besiyeri eklenir.

II. Gurel, A., S. Kontowski, K. Nichterlein, W. Friedt (1991) Embryogenesis In Microspore Of Sunflower (*Helianthus annuus* L.). Helia, 14 (14): 123-128).

- Uygun evrede olan kafalar %70'lik etil alkolde 2 dk ardından %2,5'luk NaOCl de 2 dk tutulup 2 defa distile suyla yıkanarak yüzey steriliasyonu yapılır.
- pH'sı 6-6.2 arasında olan NLN- MS besi yeri kullanılır.

- Uygun evrede olan kafalar 10ml'lik santrifüj tüpüne alınır.
- Üzerine 1 ml NLN besi yeri konulup cam bagetle ezilir.
- 44 mikometrelik filtreden geçirilir.
- Tüp ve filtre 7ml besi yeriyle çalkalanır ve süspansiyon yeni bir santrifüj tüpüne alınır.
- 30 kafaya ait mikrospor pelleti 350rpm (55g)'de 10dk santrifüj edilip yıkanır.
- Oluşan pellet 3 ml NLN besi yerinde çözülür.
- Süspansiyon 2 petri kabına ekilir.
- Mikrospor yoğunluğu ml başına 40.000 olmalıdır.
- Mirosporlar 30 C'de 1000 lux ışık altında inkübe edilir.
- Kültür medyaları her gün aynı santrifüjleme yöntemiyle değiştirilir.

III. Mohammadi PP, Moieni A, Ebrahimi A ve Javidpar F. (2011). Doubled Haploid Plants Following Colchicine Treatment of Microspore- Derived Embryos of Oilseed Rape (*Brassica napus* L.). Plant Cell Tissue Organ Culture.DOI 10.1007/s11240-011-0036-2.

- Uygun safhada olan kapitulumların yüzey sterilizasyonu yapılmıştır.
- Sterilizasyon esnasında kapitulumlar % 5.25 sodyum hipokloritte çalkalanmıştır.
- Çalkalama işleminin ardından kapitulumlar iki defa beşer dakikalık periyotlarla steril distile su ile yıkanmıştır.
- Steril edilen kapitulumlar stereo mikroskop altında yapraklarından ayrılarak açılmış, uygun boyutta olan yeşil- beyaz renkteki çiçekçikler seçilerek mikrospor izolasyonunda kullanılmak üzere steril pens ile ayrılmıştır.

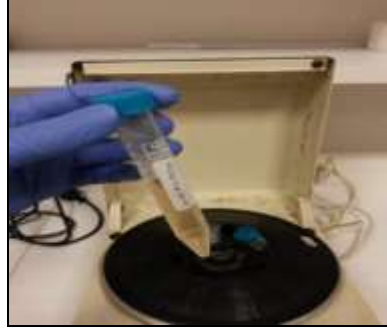
1) Çiçekçikler % 13 sukroz içeren ve pH'ı 6 olan 30 ml'lik soğuk izolasyon besiyerinde cam baget ve blenderdan geçirilmiştir.



2) Süspansiyon filtreden geçirilmiş ve 4 adet tüpe toplamda 50 ml olacak şekilde süspansiyon falkon tüplere dağıtılmıştır.



3) Mikrospor süspansiyonu 1300 rpm'de 4 dakika santrifüj edilmiştir.



4) Sonrasında filtreden geçirilerek 4- 5 ml NLN-13 sıvı besiyeri (%13 sukroz) eklenmiştir.

5) Mikrospor kültürlerinin yoğunluğunu belirlemek için bir damla örnek alınarak, Thoma lamına damlatılmış ve hücreler sayılmıştır. Ayçiçeği için literatürde önerilen ve 40.000 olan mikrospor (ml başına) yoğunluğu örneklerde sağlanmıştır.

6) Kültür 30 °C'de 14 gün süre ile karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır.

IV. Lantos, C., Juhász, A. G., Somogyi, G., Ötvös, K., Vági, P., Mihály, R., Kristóf, Z., Somogyi, N., Pauk, J., 2009. Improvement of isolated microspore culture of pepper (*Capsicum annuum* L.) via co-culture with ovary tissues of pepper or wheat. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 97:285- 293.

- Uygun safhada olan kapitulumların yüzey sterilizasyonu için kapitulumlar 100 ml'sine bir iki damla Tween 20 damlatılan %10 ticari sodyum hipoklorit çözeltisi içinde 15 dakika bekletilmiştir.
- Üç kez beşer dakika olmak üzere steril distile su ile yıkanmıştır.
- Daha sonra kapitulumlar stereo mikroskop altında yapraklarından ayrılarak açılmış, uygun boyutta olan yeşil- beyaz renkteki çiçekçikler seçilmiştir.
- Stamenler çıkartılıp anterler ön uygulama ortamına aktarılmıştır.
- Anterler kültüre alınmadan önce ilk sıcaklık ve 0.3 M mannitol içeren sıvı besiyerinde 32 °C'de, karanlık ortamda 7 gün süreyle tutulmuştur.

- Sterilizasyonu ve ön uygulama işlemleri tamamlanan anterler 0.1 mg/l 2,4 D ve 0.2 mg/l kinetin içeren B5 ortamı içinde ezilerek mikrosporların serbest hale geçmesi sağlanmıştır.
- Süspansiyon filtreden (25 µm) geçirilmiş ve falkon tüpe aktarılmıştır.
- Mikrospor süspansiyonu 900 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir ve supernatant atılmıştır.
- Pellet az miktarda besiyerinde çözündükten sonra her bir petri kabına 2 ml besiyeri ilave edilerek toplam hacim 5 ml'ye tamamlanmıştır.
- Mikrospor kültürlerinin yoğunluğunu belirlemek için bir damla örnek alınarak Thoma lamına damlatılmış ve hücreler sayılmıştır.
- Kültüre ait petriler 25 °C sıcaklıkta ve karanlık koşullarda 2 ay süre ile sçaalkalamalı inkübatörde tutulmuştur.

Mikrospor izolasyonu için optimizasyonu gerçekleştirilen protokoller ile ana adımları **Tablo 3. 10.**'da verilmiştir.

Tablo 3. 10. Optimizasyonu gerçekleştirilen protokoller ve ana adımları.				
Deneysel Adımlar	Protokol 1 (Gürel ve ark., 1991)	Protokol 2 (Mohammadi, 2011)	Protokol 3 (Todorova ve ark., 2014)	Protokol 4 (Özsan, 2014)
Bitki materyalinin temini	Tarla + Bitki yetiştirme odası koşulları	Tarla + Bitki yetiştirme odası koşulları	Tarla koşulları	Tarla koşulları
Kapitulumların yüzey sterilizasyonu	Uygun evredeki kapitulumlar sırasıyla % 70'lik etanolde ve % 2.5 NaOCl'de 2 dakika bekletildiler. Sonrasında iki kez distile sudan geçirildiler.	Uygun evredeki kapitulumlar %5.25 sodyum hipokloritte 10 dakika bekletildi ve iki defa beşer dakika olmak üzere steril distile suda bekletilerek yıkandılar.	Uygun evredeki kapitulumlar sırasıyla %96'lık etanolde 30 saniye ve %2.5'lik NaOCl (çamaşır suyu)'de 25 dakika tutuldu ve üç defa beşer dakika olmak üzere steril distile su ile yıkandılar.	Uygun evredeki kapitulumlar 100 ml'sine bir iki damla Tween-20 damlatılan % 10 ticari sodyum hipoklorit çözeltisi içinde 15 dakika bekletildi ve üç kez her seferinde beşer dakika olmak üzere steril distile su ile yıkandı.
Ön uygulama	-	-	-	Anterler kültüre alınmadan önce ilk 8 gün boyunca + 35°C sıcaklık ve 0,3 M mannitol içeren ortamda bekletildi.
Mikrospor izolasyonu	Çiçekçikler 1 ml NLN ile 10 ml'lik santrifüj tüplerine alındı ve cam bagetle ezildiler. Süspansiyon filtreden geçirildi. Tüp ve filtre 7 ml NLN besiyeri ile yıkandı ve yeni santrifüj tüpüne konularak 350 rpm'de santrifüj edildi (Heraeus Medifuge). Bu adım modifiye edilerek 1000 rpm'de 15 dakika ve 3000 rpm'de 10 dakika daha santrifüj edildi. Santrifüjden sonra 30 çiçekçiğin pelleti 3 ml NLN içinde çözüldü ve cam petriye alındı. Üzerine miktar besiyeri eklendi ve kültür sürekli ışık altında 30°C'de inkübe edildi. Bir günlük kültürden sonra yukarıda tarif edilen ek santrifüjlemeyle besiyeri değiştirildi.	Çiçekçikler %13 sukroz içeren ve pH'ı 6 olan soğuk izolasyon besiyerinde blenderdan geçirildi ve oluşan süspansiyon filtreden geçirildi. Elde edilen süspansiyon tüplere dağıtılarak 1300 rpm'de 4 dakika santrifüj edildi. Bu adım modifiye edilerek bir kere daha tekrarlandı. Oluşan pellete 25 ml mikrospor izolasyon sıvısı eklendi. Bu adım iki kere tekrarlandı. Her bir litreye 40.000 mikrospor olacak şekilde yoğunluk kontrol edildi ve mikrospor süspansiyonu küçük petrilere aktarıldı. Sonrasında kültürler 30 °C'de 14 gün süre ile inkübasyona bırakıldı. Bu 14 günden sonra çalkalayıcı açık halde 25°C'ye transfer edildi.	Binoküler mikroskopta mikrospor gözlenen boyutta çiçekçikler behere alınıp 5 ml %12'lik sukroz ve 1.9 g/l askorbik asit çözeltisinde cam baget ile ezildi. Sonrasında 20 mm'lik filtreden geçirilerek örnekler 18 ml'lik tüplere alındı. Tüplere alınan örnekler 3 ml %12'lik sukroz ve 1.9 g/l askorbik asit çözeltisi eklenerek 750 rpm'de 10 dakika, bu adım modifiye edilerek sonrasında 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Supernatant döküldü ve pellet 6 ml kültür besiyerinde çözülerek 3000 rpm'de 10 dakika tekrar santrifüj edildi. Daha sonra Charcoal içeren katı besiyerine eklendi ve petrilere alüminyum folyoya sarılıp 30 °C 'deki etüvde 3 gün boyunca bekletildi. Bu 3 günden sonra 2 günde bir besiyerlerine 2 ml kültür besiyeri eklendi.	Ön uygulama görmüş anterler 10 ml besiyerinde ezilerek filtreden geçirildi. Süspansiyon 900 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Bu adım modifiye edilerek 3500 rpm'de 15 dakika santrifüj yapıldı. Oluşan pellet bir miktar besiyerinde çözülüp cam petriye aktarıldı ve üzerine besiyeri eklenerek 5 ml'ye tamamlandı. Petrilere 25 °C'de karanlık koşulda çalkalayıcı üzerinde bekletildiler.
Kolsişin uygulaması	-	% 0.1 ve kolsişin içeren NLN besiyeri hazırlanır ve kotiledon evresindeki haploid embriyolar dört kolsişin konsantrasyonu (125, 250, 500 ve 1000 mg/l), üç zaman uygulaması (12, 24, 36 saat) ve iki sıcaklık (8 ve 25 °C) uygulamalarından geçirilir. Sonrasında embriyolar kolsişin içermeyen NLN besiyerlerine transfer edildi.	-	-
Kallus rejenerasyonu	NLN besiyeri	NLN besiyeri	MS + Gelrite + Charcoal + Sukroz MS + Gelrite + Sukroz MS + Sukroz	B5 + 0.1 mg/l 2,4 D + 0,2 mg/l kinetin
Organ rejenerasyonu	MS besiyeri	Sıvı MS (% 2 sukroz, yarı MS ve 0.1 mg/l giberellik asit, % 0.7 agar-agar, pH: 5.8)	MS + Glutamine + Serine	B5 + % 0.8 agar + % 3 sukroz

3.2.3. Polen Işınlama ile Haploid Bitkilerin Elde Edilmesi

Projemizin 2. gelişme raporu için istenen revizyona uygun olarak bu rapor dönemine kadar haploid bitki elde edilememesi nedeniyle proje önerimizde anter ve mikrospor kültürü ile haploid bitkilerin elde edilememesi durumunda B planı olarak ışınlanmış polen uyartımıyla ve ışınlanmış polenlerle dişi çiçeklerin tozlanması yoluyla haploid bitki elde edilmesi yoluna gidileceği ve uyartım sonucu oluşan haploid embriyoların bitkiye dönüştürülebilmesi için de devamında embriyo kültürü yöntemi uygulanacağı bilgisine yer verilmiştir.

Bu nedenle 2017 Nisan döneminde ışınlanmış polenlerle dişi çiçeklerin tozlanması yoluyla haploid bitki elde edilmesi çalışmalarına başlanmıştır.

3.2.3.1.Bitkilerin Yetiştirilmesi

Proje paydaşlarından olan Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü'ne ait araziye restorer IMI-K2-R-SN-7/15, IMI-K2-R-SN-22/15, IMI-K2-R-SN-25/15 hatlarına ait materyalin ekimi Nisan 2017 döneminde, SURES-K2-AD-SN-2/15, SURES-K2-R-SN-9/1, IMI-K2-AD-SN-2/15 restorer hatlarına ait materyalin ekimi Mayıs 2017 döneminde gerçekleştirilmiştir. Ekim yöntemi sıraya ekimdir. Ekim elle ocakvari şekilde yapılmıştır. Ocaklardaki fazla bitkiler sonra seyreltilmiştir. Sıra üzeri 30 cm, sıra arası mesafe 70 cm, sıra uzunluğu parselde 6 metredir (**Şekil 3.10.**). Ayrıca projeye CL 069 A ve IMI 044 A materyali de dahil edilerek (stoplazmik erkek kısır hatlar) yöntemin başarısının belirlenmesine katkı sağlanmıştır. Bu hatlar CMS olduğundan emasküle edilmesine gerek yoktur.

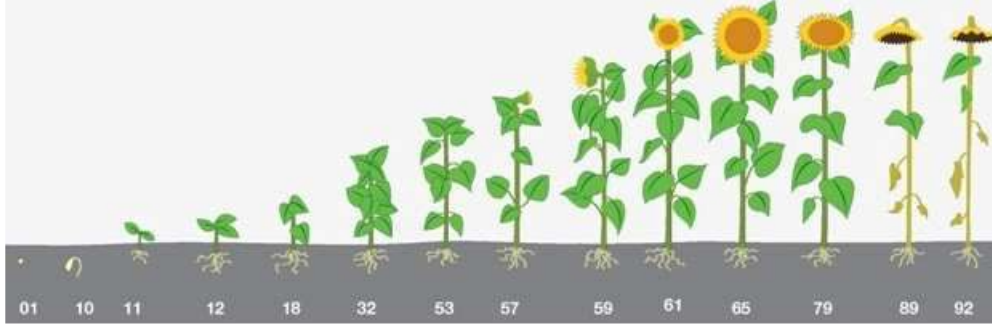




Şekil 3.10. Restorer ve CMS hatlara ait materyalin Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü'ne ait araziye ekimi (A,B, C).

3.2.3.2. Çiçeklerin İzolasyonu

Işınlanmış polenlerle tozlanacak proje materyalleri ve CMS hatlar ekimden yaklaşık 2 ay sonra (**Şekil 3.11.**), çiçeklenme öncesi **Şekil 3.12.**'de de görüldüğü gibi bez torbalar ile izole edilerek dışarıdan polen bulaşması engellenmiştir.



Şekil.3.11. Ayçiçeği Bitkisinin Fenolojik Dönemleri (Alttaki rakamlar ekimden sonraki günleri göstermektedir (BASF, 2008).



Şekil 3.12. Bez torbalar ile çiçekleri izole edilen bitkiler.

3.2.3.3. Emaskülasyon

Emaskülasyon, alıcı bitkinin erkek organlarının bitkiden uzaklaştırılması ve tozlayıcı olarak kullanılacak bitkinin polenlerinin emasküle edilmiş bitkinin dişi organlarına bulaştırılması ile gerçekleştirilmektedir. Emaskülasyon işlemi elle yapılabildiği gibi, son yıllarda yeni bir sistem olarak kimyasal kısırlaştırma maddeleri de (Chemical Hybridizing Agent=CHA) yoğun olarak kullanılmaya başlamıştır. Bu proje çalışmasında el ile emaskülasyon yapıldı. İşlem sabah gün aydınlandıktan hemen sonra ayçiçeği tablası üzerindeki çiçekcikler açmadan önce anterler alınarak gerçekleştirildi (**Şekil 3.13a**). Anterlerin emaskülasyonu ince uçlu pens yardımı ile yapıldı. Olgunlaşan çiçekciklerdeki bütün anterlerin alındığına emin olunduktan sonra çiçek tablası çeşme suyu ile yıkanıp eğer tablada kalan polen var ise bunların etkisiz hale getirilmesi sağlandı (**Şekil 3.13b**). Tabla üzerindeki çiçekcikler aynı anda olgunlaşmadığı için bu işlem her çiçek başı için bütün çiçekcikler emasküle edilene kadar günlük olarak uygulandı. Emaskülasyon işlemi sonrası çiçekleri dış tozlanmadan koruyan torbalar çiçek tablası üzeri ya da etrafında böcek olmadığından emin olarak kapatıldı (**Şekil 3.14c**).



Şekil 3.13. a) El ile emaskülasyon, b) Çeşme suyu ile yıkama, c) Torbalama

3.2.3.4. Polenlerin Toplanması ve Işınlanması

Işınlama işleminin yapılacağı gün sabah erken saatte Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü'ne ait arazide mevcut bitkilerden toplanan ayçiçeği polenleri, aynı gün yapılacak ışınlama işlemine kadar +4°C soğutucuda, yoldayken ise buz aküleri ile soğutulularak muhafaza edildi. Işınlama işlemi gamma ışını (γ) ile sterilizasyon yapan Gamma-Pak (Çerkezköy-Tekirdağ) firması tesislerinde gerçekleştirildi. Işın kaynağı olarak kobalt-60 (Co60) kullanılmış ve projemizde literatür doğrultusunda 500 gy, 750 gy ve 1000 gy olmak üzere üç farklı ışın dozu kullanılmıştır (**Şekil 3.14**). **Tablo 3.9**.da projemizin bitki materyali, özellikleri ve her bir doz için kullanılan örnekleri ifade eden çiçek tablası örnek kodlarına ait bilgiler yer almaktadır.

Tablo 3.11. Çalışmada kullanılan bitki materyali, özellikleri ve uygulanan dozlar ile çiçek kodları.

Genotipler	Özellikleri	Çiçek Kodu (Helianthus:H)		
		500 Gy	750 Gy	1000 Gy
IMI-K2R-SN-7/15 (Emasküle)	İMİ grubu herbisitlere dayanıklı, orobanşa dayanıklı, mildiyö hastalığına dayanıklı restorer hat.	H24, H29	H11, H4, H15, H63	H23 , H10 , H1 , H16
IMI K2R SN-22/15 (Emasküle)	İMİ grubu herbisitlere dayanıklı, orobanşa dayanıklı, mildiyö hastalığına dayanıklı restorer hat.	H2, H8, H12	H30, H68	H25, H64
IMI K2R SN-25/15 (Emasküle)	İMİ grubu herbisitlere dayanıklı, orobanşa dayanıklı restorer hat.	H27, H62	H9, H26	H5 , H7
IMI K2AD SN-2/15 (Emasküle)	İMİ grubu herbisitlere dayanıklı, orobanşa dayanıklı ana hattı.	H32, H67	H66 , H3, H6	H13, H28, H65
SURES K2AD SN-2/15 (Emasküle)	SU grubu herbisitlere dayanıklı, orobanşa dayanıklı, mildiyö hastalığına dayanıklı restorer hat.	H14	H75	H34, H70
SURES K2R SN-9/15 (Emasküle)	SU grubu herbisitlere dayanıklı, orobanşa dayanıklı, mildiyö hastalığına dayanıklı restorer hat.	H35, H72, H73 H80	H33, H74 H79	H69, H71 H81
IMI 044 (CMS)		H19, H20, H54, H56, H59, H39, H44	H18, H22, H42, H53, H57, H38, H77, H60	H17, H45, H78, H43, H61, H31, H58, H21, H52
IMI 069 (CMS)		H36, H47, H76, H49	H51, H40, H46, H50	H55, H37, H41



Şekil 3.14. Işınlanmış ayçiçeği polenleri ve ışınlama dozlar bilgilendirme etiketleri.

3.2.3.5. Tozlama

Sabah toplanan polenlerin aynı gün öğlene kadar ışınlama işlemi tamamlanmıştır ve ışınlanan polenler bekletilmeden öğleden sonra tarlaya dönülüp, tozlaştırmalar gerçekleştirildi. Tozlama öncesi daha önce emasküle edilerek bez torbalar ile kapatılan bitkilerin bez torbaları açılarak örneklerin taç yaprakları ayrıldı (**Şekil 3.15A.**). Daha sonra ışınlanmış polenler, taç yaprakları ayrılan bu bitkilerin kendi çanak yaprakları ile sürtülerek tozlama işlemi gerçekleştirilmiştir (**Şekil 3.15B.**). Çiçek kafaları tozlama sonrası ışınlama dozu, tarih ve ıslah hattı ismini belirtecek şekilde etiketlendi ve yabancı tozlaşmayı önlemek için tekrar torbalandı, daha sonra 12-15 gün embriyo oluşumu için beklendi. Ayçiçeği tablasındaki çiçekcikler dıştan içe doğru farklı günlerde açtıkları için tozlama sonrası belli bir günde alınan çiçek tablalarında farklı gelişme aşamasında bulunun embriyolar mevcuttur. Dışta kalan çiçekciklerden oluşan embriyolar görece iç kısımdakilerden daha olgundurlar. Polenlerin doğada çimlenme özelliklerini 2-3 gün koruyabildikleri göze alınırsa her çiçek kafasında tozlaşma sonrası geçen günün 2 gün öncesindeki embriyo gelişme aşamasındaki embriyolar da tablada bulunmakta olduğu farz edilebilir. Örneğin, tozlaşma sonrası 13. günde alınan bir çiçek tablasında tozlaşma sonrası 11. gündeki kadar gelişmiş embriyolar da bulunmaktadır. Tozlama ardından çiçeklere yabancı polen ulaşmasını engellemek için tekrar torbalama işlemi yapıldı.



Şekil 3.15. A) Işınlama öncesi taç yaprakların ayrılması, B) Polene bulanmış çanak yapraklar kullanılarak el ile tozlaştırma, C) Tozlama sonrası torbalanarak dışarıdan gelecek polen kaynaklarına karşı izole edilmiş çiçekler.

3.2.3.6. Embriyoların Çıkartılması ve Kültürü

Partenogenik bitki eldesi amacıyla gerçekleştirilen doku kültürü çalışmaları için uygun embriyo aşamasındaki olgunlaşmamış tohumlar materyal olarak kullanıldı.

3.2.3.6.1. Tohumların Yüzey Sterilizasyonu

Tozlamalardan 12–20 gün sonra hasat edilen çiçek tablaları Marmara Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Bitki Biyoteknolojisi laboratuvarına transfer edilmiştir.

Uygun safhadaki embriyoları içeren tohumlar çiçeklerden ayrılır ayrılmaz yüzey sterilizasyonu için 2-3 damla Tween 20 içeren %20'lik sodyum hipoklorit çözeltisine alındı ve 20 dakika çalkalanarak bekletildi. Ardından tohumlar üzerinde deterjan köpüğü kalmayana dek (yaklaşık 5-6 defa) steril distile su ile yıkandı. Durulanan tohumlar daha sonra steril filtre kağıdı üzerine alınarak kurumaları bekledi (**Şekil 3.16.**).



Şekil 3.16. Işınlama sonrası tozlama ile elde edilen olgunlaşmamış tohumların ayıklanması ve yüzey sterilizasyonu.

3.2.3.6.2. Embriyoların Çıkarılması ve Uygun Embriyo Aşamasının Belirlenmesi

Sterilizasyon sonrası kabukları ayıklanan tohumların tohumlar sayılarak steril bir pens ve bisturi yardımıyla tek tek açılmış ve incelenmiştir. Embriyo aşamasının belirlenmesi için tohumlarda embriyo kısmının çıkartılıp stereomikroskopla gözlenmesi sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Daha önce yapılan benzer çalışmalar ışığında uygun embriyo aşamasının tozlaşmadan sonraki 12-20 gün aralığında elde edilebileceği belirlendi ve bu günlerde alınan çiçeklerden elde edilen tohumlar üzerindeki binoküler mikroskopla (Olympus Binoküler CKX31 Inverted Mikroskop) yapılan gözlemlerle öngörü doğrulandı (**Şekil 3.17.**).



Şekil 3.17. tozlaşmadan 14 gün sonra IMI 044 (CMS) hattına ait olgunlaşmamış embriyolar.

3.2.3.6.3. Besin Ortamları ve Kültür Koşulları

Embriyo kurtarma çalışmalarında boş tohumlar (embriyo içermeyen) atılmış, olgunlaşmamış embriyolar kurtararak, kurtarılan embriyolar önce petri kaplarında kültüre alınmış ve A (Aspiroz, 1988), D (Dagüstü, 2010) ve FM (Freyssinet, 1988) olmak üzere üç farklı besin ortamından yararlanılmıştır (**Tablo 3.9**). Embriyoların bitkiye dönüşmesi, köklenip mikroçoğaltım aşamasına gelmesinden sonra ise 5 cm çaplı ve 9 cm yükseklikteki kavanozlara aktarılmıştır.

Tablo 3.12. Çalışmada kullanılan besi ortamları ve içerikleri.

Besi Ortamları	Tuzlar	Vitamin	Sukroz	Bitki Büyüme Düzenleyicileri	Kaynak
A	1/2 MS	B5	20 g/L	—	Aspiroz, 1988
D	MS	MS	20 g/L	—	Dagüstü, 2010
FM1	MS	MS	90 g/L	0.05 mg/L BAP	Freyssinet, 1988
FM2	MS	MS	30 g/L	0.01 mg/L BAP	Freyssinet, 1988
FM3	B5	B5	10 g/L	0.02 mg/L IAA	Freyssinet, 1988

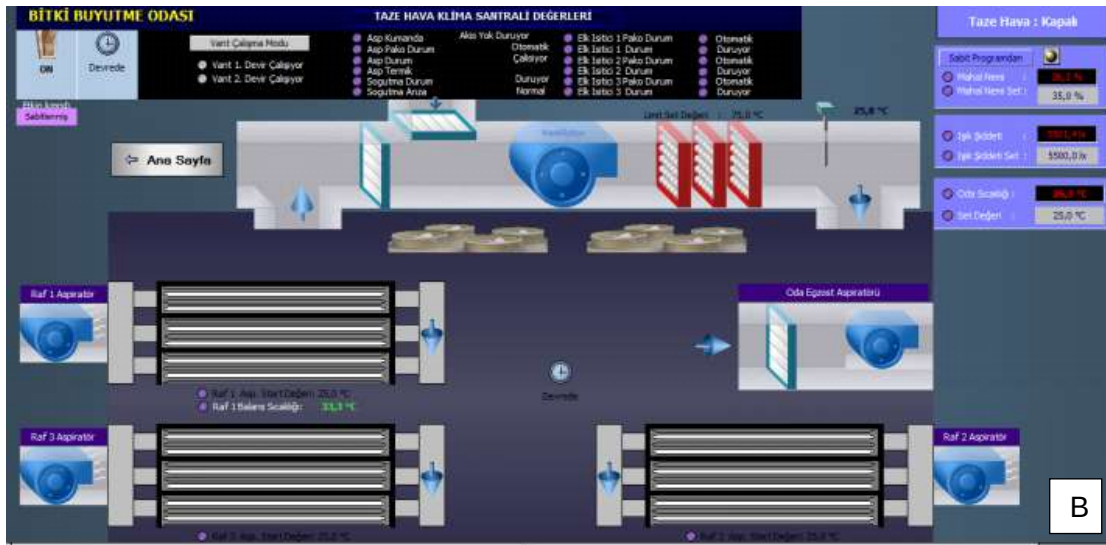
Besin Ortamının Hazırlığı ve Sterilizasyonu: Bütün besi ortamlarında yarı katılaştırıcı olarak 2,2 g/L konsantrasyonda phytagel kullanıldı ve pH, NaOH ve HCl ile 5,7-5,8 aralığında ayarlandı. Ardından besin ortamları 121 °C sıcaklıkta 3 saat otoklavlanarak sterilizasyonları sağlandı. Sterilizasyonu tamamlanan besi ortamlarına laminar akışlı kabin içerisinde bitki büyüme düzenleyicileri de eklenip petri kapları (yaklaşık 20 ml) ve magenta kutularına (yaklaşık 50 ml) dökülerek katılaşmaya bırakılmış, ardından soğuyan kapların kapakları örtülerek hava almaması için parafim ile ağızları kapatılmış ve kullanılacağı zamana kadar oda sıcaklığında muhafazaları sağlandı.

FM prosedüründe aynı çiçek tablası üzerinde farklı büyüme aşamalarında bulunan embriyolar ve sürgün verip köklenmeyen embriyolar için olmak üzere 3 farklı besi ortamı kullanılmıştır. FM1 erken aşamadaki embriyolar için kullanılmış yüksek sukroz konsantrasyonu içeren ortamdır, FM2 ortamı daha az sukroz içermekte ve görece daha olgun embriyoların kültürü için kullanıldı. FM3 ise sürgün verip kök oluşturamayan bitkicikleri köklendirmede kullanıldı.

Stok Bitki Büyüme Düzenleyicilerin Hazırlanması: Bitki büyüme düzenleyicileri ambalajlarının üzerinde yazan hazırlama şekline uygun olarak 1 mg/ml konsantrasyonda hazırlandı. Bunun için 100 mg konsantre bitki büyüme düzenleyici 5 ml uygun çözücü ile (NaOH, EtOH, Distile su) çözüldükten sonra üzeri distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

Hazırlanan çözeltinin sterilizasyonu laminar akışlı kabinde filtrasyon ile yapıldı. Filtre edilen çözelti 2 ml ependorf tüplere alınarak kullanılacağı süreye kadar muhafazası için -20°C'lik dondurucuya alındı.

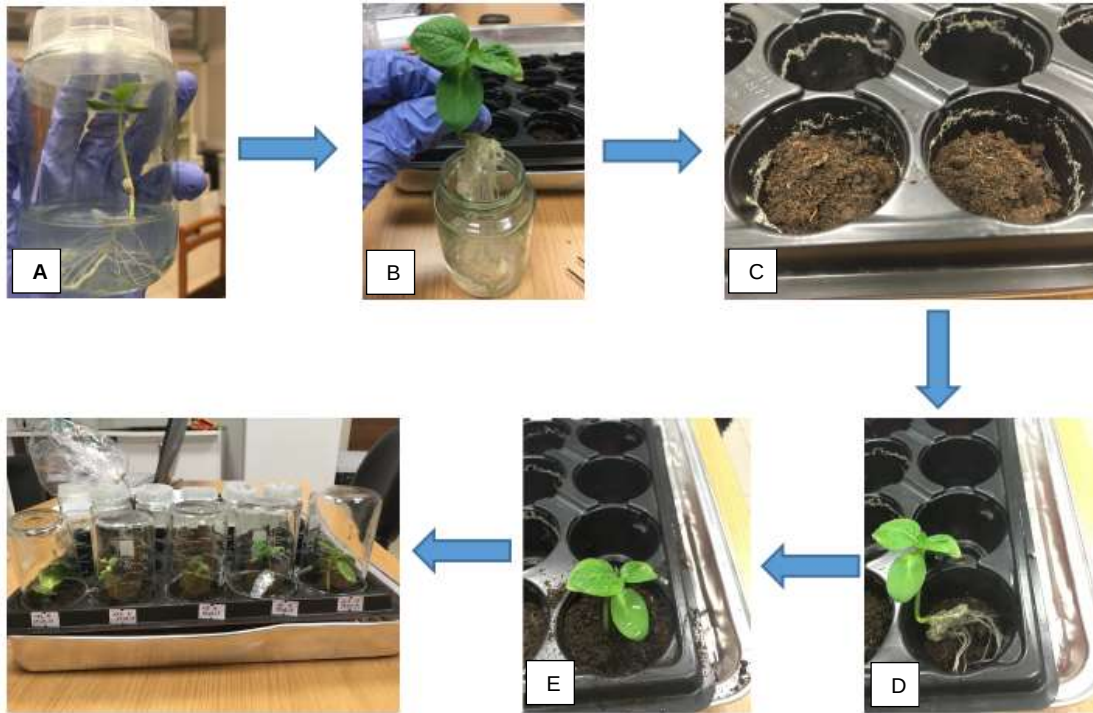
Kültürler çimlenme için 25°C sıcaklık 6000 lux ışık şiddeti olan kültür odasında 16/8 saatlik fotoperiyotta muhafaza edildi (**Şekil 3.18.**). Petri kaplarında çimlenen embriyolar aynı besi ortamından içeren magentalarda altkültüre alındı. Çimlenmeyen embriyolar ayda bir altkültüre alındı. Çimlenip güçlü kök ve sürgün oluşturabilen bitkicikler toprağa şaşırtılıp iklime alıştıırıldı.



Şekil 3.18. Kültürler için 25°C sıcaklık 6000 lux ışık şiddeti ve 16/8 saatlik fotoperiyot uygulanan bitki yetiştirme odası (A) ve odanın otomasyon sistemine ait bilgisayar yazılım kontrol ekranı (B).

3.2.3.6.4. In Vitro Bitki Gelişmeleri ve Dış Koşullara Alıştırma

Sağlıklı ve güçlü kök yapısı oluşturabilen sürgünler kotiledon sonrası yaprakları oluşunca toprağa şaşırılarak aklimatizasyon işlemine başlandı. Kültür ortamından zarar vermeden alınan bitkicikler 100 ml toprak içeren viyollere alınıp distile su ile sulandı ve zerileri beher ile kapatılıp nem oranının kademeli olarak azaltılması sağlandı. Birkaç gün sonra düşük nem oranına sahip havaya alışan ve büyüyen bitkiciklerin üzerinden beherler alındı ve bitkicikler daha büyük saksılara taşındı. Viyol yerine saksılara ekilen bitkiciklerin bulunduğu ortamdaki nemi yüksek tutmak için saksılar streç film ile sarılıp bir gün öyle bekletildikten sonra üzerlerine birkaç delik açılarak kademeli şekilde düşük nemli havaya alıştırılmaları sağlandı (şekil 3.19).



şekil 3.19. *In vitro* bitkiciklerin besin ortamından ayrılması ve besin ortamı kalıntılarından kurtarma (A,B), steril toprak içeren plastik viyollere dikim (C, D, E), dış ortama alıştırma (F) aşamaları.

3.3. Dihaploid Bitkilerin Eldesi

Haploid olduğu belirlenip sağlıklı şekilde aklimatizasyonu sağlanan bitkilerin apikal uçları %2 DMSO içeren %0,15'lik kolşisin zltisi emdirilmiş pamuklar ile 5 saat muamele edildi (Yan et al. 1985) (şekil 3.20). Uygulama sonrası uygun boyuta ulaşan yapraklardan örnek alınarak flow-cytometry yöntemi ile tekrar ploidi analizi yapıldı. Double-haploid olduğu belirlenen bitkilerden fertil olanlarının çiçekleri torbalanarak kendillenmeleri sağlandı.



Şekil 3.20. Apikal uçlara pamuğa emdirilmiş kolşisin uygulaması.

3.4. Ploidi Seviyesinin Belirlenmesi

Toprağa alıştırılan bitkiciklerin kotiledon sonrası 2-4 yaprak itibariyle alınan yapraklardan flow sitometri yöntemiyle ve toprağa şaşırtma sırasında bitkiciklerden alınan taze kök uçları kullanılarak yapılan kromozom sayımı yöntemiyle bitkiciklerin ploidi seviyesi belirlendi.

3.4.1. Kromozom Analizi

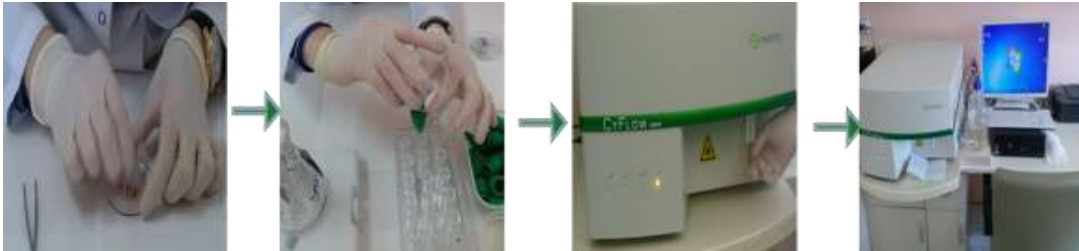
İşlem için gerekli somatik kromozomlar kök ucu meristem hücrelerinden elde edildi. Bu çalışmadaki amaç kromozom sayımının net bir şekilde yapılabilmesidir. Bunun için olabildiğince fazla hücrenin metafaz I aşamasındayken fikse edilebilmesi hedeflendi bu sebeple de taze kök uçları eksplant olarak seçildi. Fiksasyon işlemi için uygulanan prosedür aşamaları şunlardır:

1. Taze kökler 2 ml ependorflara alınarak üzerlerine %0,04'lük kolşisin çözeltisi eklendi ve 90 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletildi.
2. Ardından kökler 3/1 oranında absolut etanol/asetik asit çözeltisinde en az 16 en fazla 24 saat bekletildi.
3. İşlem sonunda önce %96'lık sonra %70'lik etanol çözeltisi ile yıkanan kökler %0,5 lik pektinaz çözeltisi ile (pH=4,2 sitran tamponunda hazırlanan) 37 °C'de 30 dk muamele tutuldu.
4. Daha sonra 1N HCl çözeltisine alınan kökler burada bir saat bekletildi.
5. Ardından Schiff's reaktifine alınan kökler karanlık ortamda en az 30 dakika bekletildi.
6. Sonrasında lam üzerine alınan kökler üzerlerine 1 damla %2'lik asetoorsein çözeltisi damlatılarak ezme preparat hazırlandı ve florasen mikroskopta gözlemler gerçekleştirildi.

3.4.2. Flow Analizi

Elde edilen bitkilerin yaprak dokularından ploidy düzeyleri flow sitometri yöntemiyle, çekirdek DNA içeriklerinden yararlanılarak saptanmıştır. Flow sitometriyle çekirdek DNA analizlerinin bir kısmı, Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Bitki Genetiği ve Sitogenetiği Laboratuvarında bulunan PARTEC (CyFlow Space) marka Flow sitometri cihazı kullanılarak gerçekleştirildi, bir kısmı ise Marmara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü Bitki Biyoteknolojisi ve Proteomiks Laboratuvarında bulunan aynı model Flow sitometri cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Örnekler İstanbul'dan Tekirdağ'a buz aküleri ile soğutularak taşınmıştır. Ölçümlerde standart olarak çavdar kullanılmıştır. Analizlerde PARTEC firmasının Dapi hazır kitleri (CyStein UV Precise P) kullanıldı ve üretici firmanın protokolü takip edildi (**Şekil 3.21**). Kullanılan protokolün adımları şunlardır:

1. Ayçiçeği ve çavdar yapraklarından 0,5 cm²'lik parçalar alınarak üzerlerine 500 µl Extraction Buffer ilave edilerek plastik petri üzerinde jilet ile parçalandı.
2. Parçalanma işleminden sonra yaklaşık 40 saniye petride bekletilen süspansiyon ardından 30 µm'lik filtrelerden geçirilerek tüp içerisine transfer edilmiştir.
3. Tüp içerisine 2 ml stainin solution (Dapi) ilave edilerek hazırlanan örnek ışısız bir ortamda 30-60 dk bekletilmiştir.
4. Bu sürenin sonunda örnekler flow sitometri cihazı ile analiz edilerek değerlendirilmiştir.



Şekil 3.21. Flow analizinin adımları.

3.5. Dihaploid Bitkilerin Dayanıklılık Testleri ile Doğrulanması

Elde edilen dihaploid bitkilerin tohumlar Trakya TAE bitki büyütme odasında saksılara aktarılarak bitki tohumları yetiştirilmiştir. Yetiştirilme esnasında IMI grubu herbisit uygulanarak dayanıklı olanlar belirlenmiştir. IMI grubu herbisitler bitkiler 4-6 yapraklı olduğunda ve 125 cc dozda bitki yapraklarına püskürtme yoluyla uygulanmıştır. IMI grubu herbisite dayanıklılığı uygulamadan 1 ve 2 hafta sonra olmak üzere 1-9 skalasına göre değerlendirilmiştir. Herbisit uygulanan bitkilerin 1-9 skalasına göre "1" değerleri aldığından dayanıklı olduğu kanıtlanmıştır.

Ayrıca saksılara ekilirken orobanş bulaştırılmış ve dayanıklı tek bitkiler belirlenmiştir. Orobanş tohumları Trakya'da farklı lokasyonlardan toplanan tohumların karışımından oluşmuştur. Yani projede denemede kullanılan orobanş tohumu yeni ırkların karışımından

oluşmaktadır. Orobanş inokülasyonu yöntem bölümünde de belirtildiği gibi, saksı toprağına karıştırılmıştır. Sonra orobanş bulaşık saksı toprağına tohumlar ekilmiştir. Orobanşlar genellikle 45-50 günde toprak yüzeyine çıkmakta ve söz konusu materyalin dayanıklılığı böylece belirlenmektedir. Bitkiler tohum alana kadar yetiştirildiğinden dolayı dayanıklılık, bitkileri sökerek değil de toprak yüzeyine çıkan orobanşların gözlenmesiyle belirlenmiştir.

4. BULGULAR

4. 1. Bitkilerin Yetiştirilmesi

Marmara Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Bitki Biyoteknolojisi laboratuvarında mevcut bitki yetiştirme odası koşullarında büyütülen örnekler (G1:IMI-K0-R-SN-7/13, G2:IMI-K3-R-SN-8/13, G3:SURES-K5-R-SN-4/13 ve G4:SURES-K0-A-SN-1/13) ve TTAE bünyesindeki tarlaya ekilen farklı genotiplere (G1: SURES K2 AD-SN 2/15, G2: İMİ K2 AD-SN 2/15, G3: İMİ K2 R-SN 7/15, G4: SURES K2 R-SN 9/15, G5: İMİ K2 R-SN 22/15, G6: İMİ K2 R-SN 25/15) ait ayçiçeği örnekleri kullanıldı. In vitro uygulamalarda kullanılacak kapitulumların laboratuvara transferi, tarla koşullarında ayçiçeği yetiştirilmesi için uygun iklim koşullarının sağlandığı mevsimsel dönemlerde gerçekleştirilerek doku kültürü çalışmalarına devam edilmiştir.

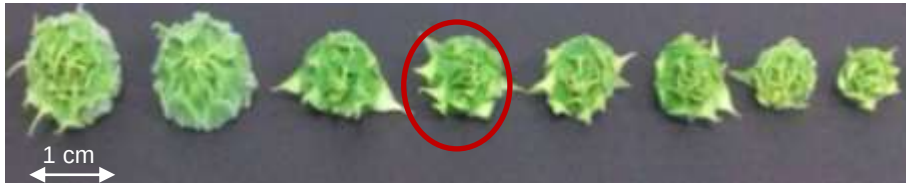
4.2. Haploid Bitki Eldesi

4.2.1. Anter Kültürü ile Haploid Bitkilerin Elde Edilmesi

4.2.1. 1. Kapitulum büyüklüğünün ve mikrospor gelişim aşamasının belirlenmesi

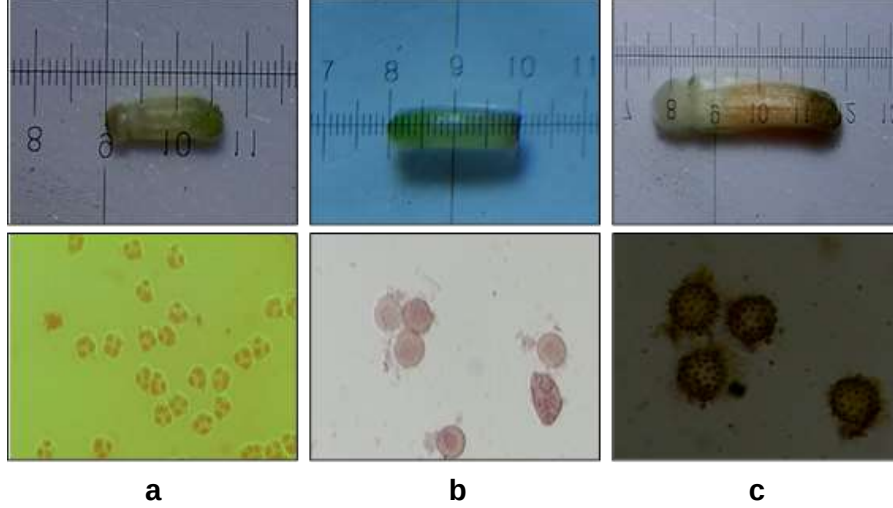
Çalışılan tarla materyallerinin kapitulum büyüklüğünün sera materyali gibi belirli bir aralıkta olmadığı, genotipe, ana kapitulum veya yan kapitulum olmasına, iklimsel koşullara göre değişiklik gösterdiği gözlemlendi. Buna bağlı olarak da mikrosporların gelişimlerinin orta-geç tek nukleuslu evrede olduğu çiçekçik boyutunun da her kapitulumda farklı olabileceği gözlemlendi. Bu yüzden çalışılan her kapitulum için çiçekçik boyutu ayrı ayrı belirlendi.

Bu çalışmalar yapılırken ezme preparat yöntemi kullanıldı. Farklı boyutlarda alınan tomurcukların içerisinde çiçekçikler hasat edilip uygun anter boyu saptanmıştır. 1-2 cm aralığındaki tomurcuklarda (**Şekil 4.1.**) uygun safhadaki mikrospor içeren çiçekçikler bulunmuştur.



Şekil 4.1. Farklı boyut ve safhalardaki ayçiçeği kapitulumları.

Alınan tomurcuklar incelendiğinde (**Şekil 4.2.**) 1,85–2 mm boyutundaki çiçekçiklerde (a) uygun evrede mikrosporların bulunduğu saptanmıştır. Mikrosporların 1.85mm'den daha küçük boyuttaki çiçeklerde (b) tetrat halinde, 2mm'den daha büyük çiçekçiklerde (c) ise polen halinde oldukları görüldü.

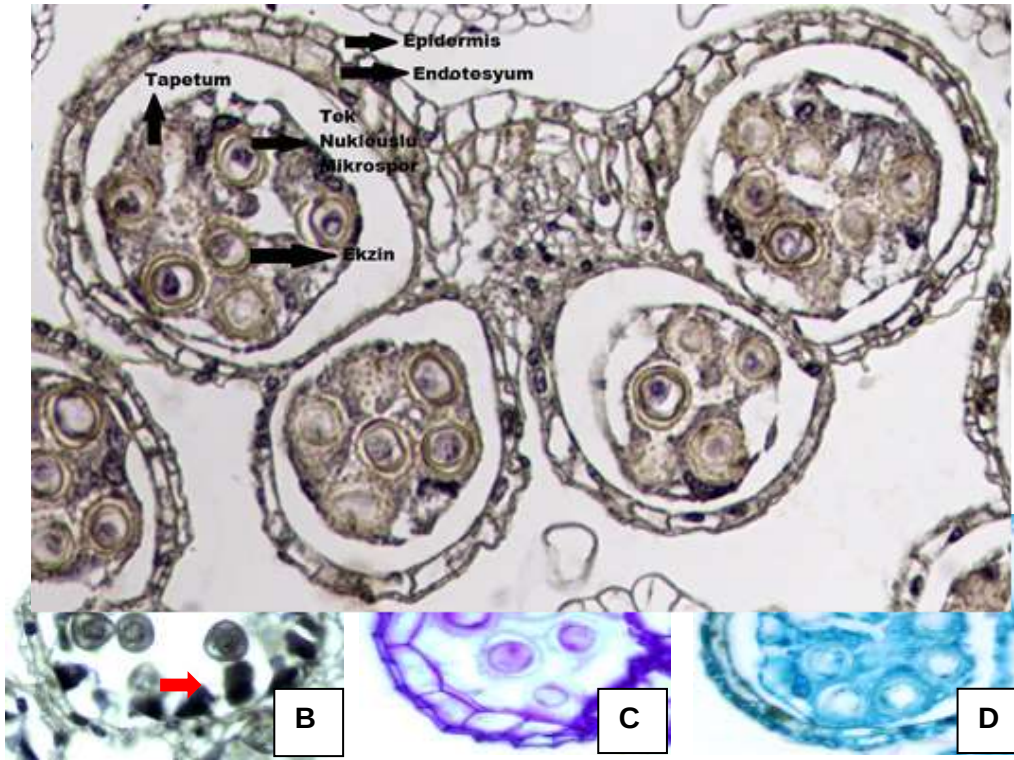


Şekil 4.2. Farklı boyutlardaki çiçekçikler bunlara ait mikrospor safhaları ve polen görüntüleri. (a: 2 cm'den küçük çiçekçik ve tetrat görüntüsü, b: 2 cm büyüklüğündeki çiçekçik ve mikrospor görüntüsü, c: 2 cm'den büyük çiçekçik ve polen görüntüsü.)

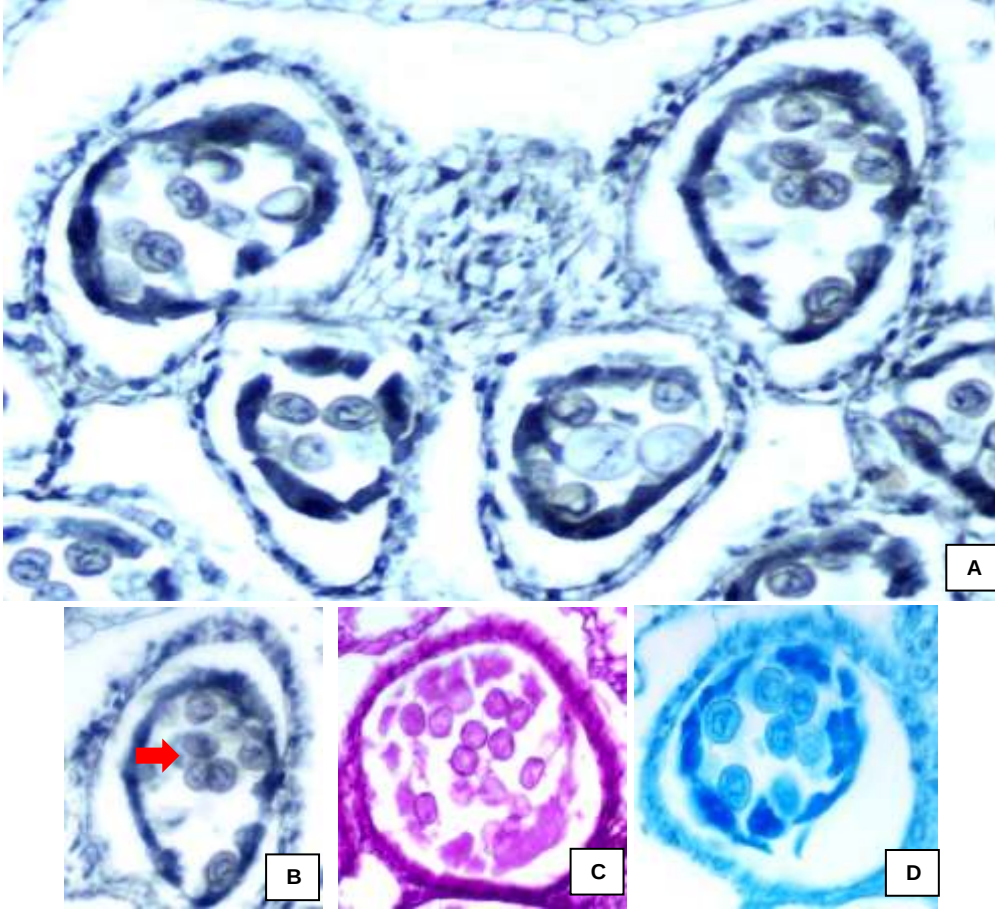
Diğer taraftan çalışılan tarla materyallerinin kapitulum büyüklüğünün sera materyali gibi belirli bir aralıkta olmadığı, genotipe, ana kapitulum veya yan kapitulum olmasına, iklimsel koşullara göre değişiklik gösterdiğinin gözlenmesi nedeniyle anter örnekleri ezme preparat yöntemi yanısıra parafin metodu ile de incelendi.

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde farklı örnekler ait anterlerin embriyolojik gelişim bakımından birbirleri arasında farklılık göstermediği belirlendi. Tüm örnekler ait anterler gelişimin başında epidermis ile çevrili, yuvarlak-elips şeklinde ve meristematik hücrelerden oluşmuş homojen bir kitledir. Gelişim ilerledikçe anterler dört loblu (tetrasporangiyat) hale gelir (**Şekil 4.3A, 4.4A, 4.5A, 4.6A, 4.7A, 4.8A**). Her bir anter lobunda 3-4 hipodermal hücre farklılaşarak arkespor hücrelerini meydana getirir. Bu hücreler dışa doğru anter çeper tabakalarını, içe doğru sporogen hücreleri vermek üzere ardışık olarak bölünür. Birçok angiospermde olduğu gibi ayçiçeği anterlerinde de anter çeper tabakası dıştan içe doğru tek tabakalı epidermis, endotesyum, ara tabaka ve tapetumdan meydana gelir. En iç tabaka olan tapetum tabakası olgun polen taneleri verecek olan sporogen dokuyu sarar. Gelişimin başında sporogen hücreler birkaç mitoz bölünme ile sayılarını artırarak polen (mikrospor) ana hücreleri (PAH) olarak farklılaşır. Mayoz bölünme sırasında ve mayoz sonrasında anterlerde hacimsel olarak bir artma gözlenir. Gelişim ilerleyip genç mikrosporlar tetrattan

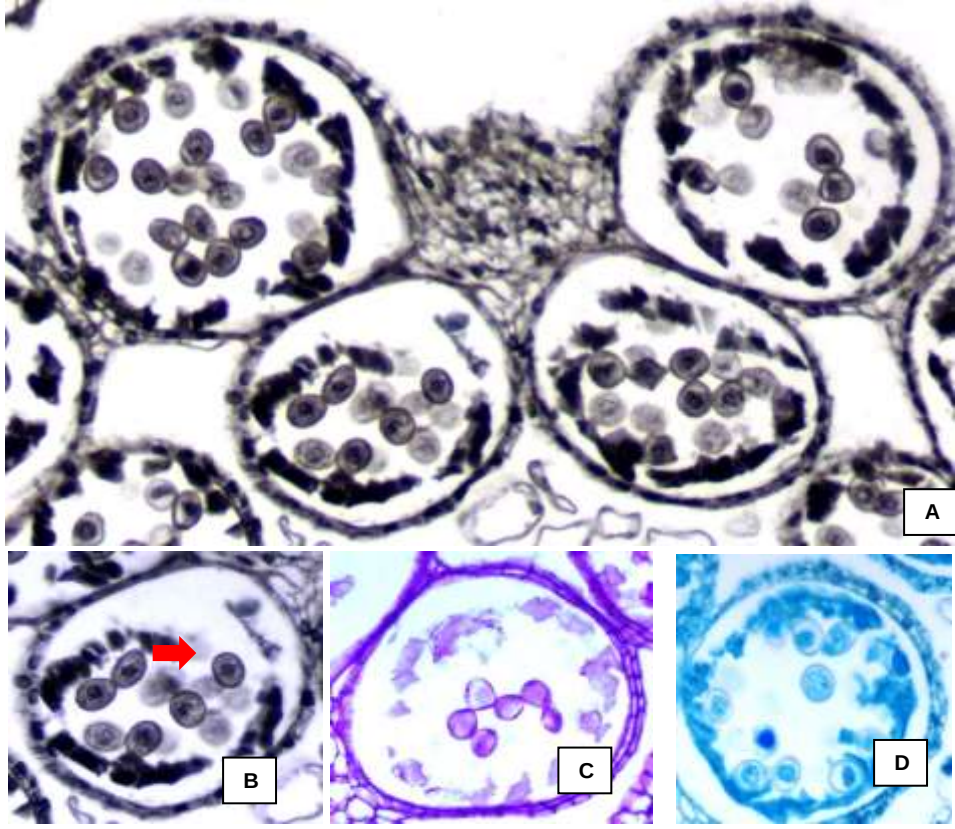
salındıktan sonra ara tabaka hücre ölümüne uğrayarak körelir. Tapetum hücreleri ise hücre çeperlerini kaybederek genç mikrosporların arasına dağılır ve anter lokusunu doldurur. Epidermis ve endotesyum gelişimin sonuna kadar kalır. Tetrattan salındıktan sonra tek nukleuslu olan genç mikrospor tanelerinin ekzin çeperleri gelişmeye başlar. Olgunlaşmış bir ayçiçeği poleni ekinat tipte ekzin çepere sahiptir. Yapılan sitokimyasal boyamalar sonucunda anter çeper tabakalarının ve genç mikrosporların çözünmeyen polisakkaritler bakımından zengin olduğu belirlendi (**Şekil 4.3C, 4.4C, 4.5C, 4.6C, 4.7C, 4.8C**). Bunun yanında genç mikrosporların protein bakımından anter çeper tabakalarına göre daha zengin olduğu gözlemlendi (**Şekil 4.3D, 4.4D, 4.5D, 4.6D, 4.7D, 4.8D**).



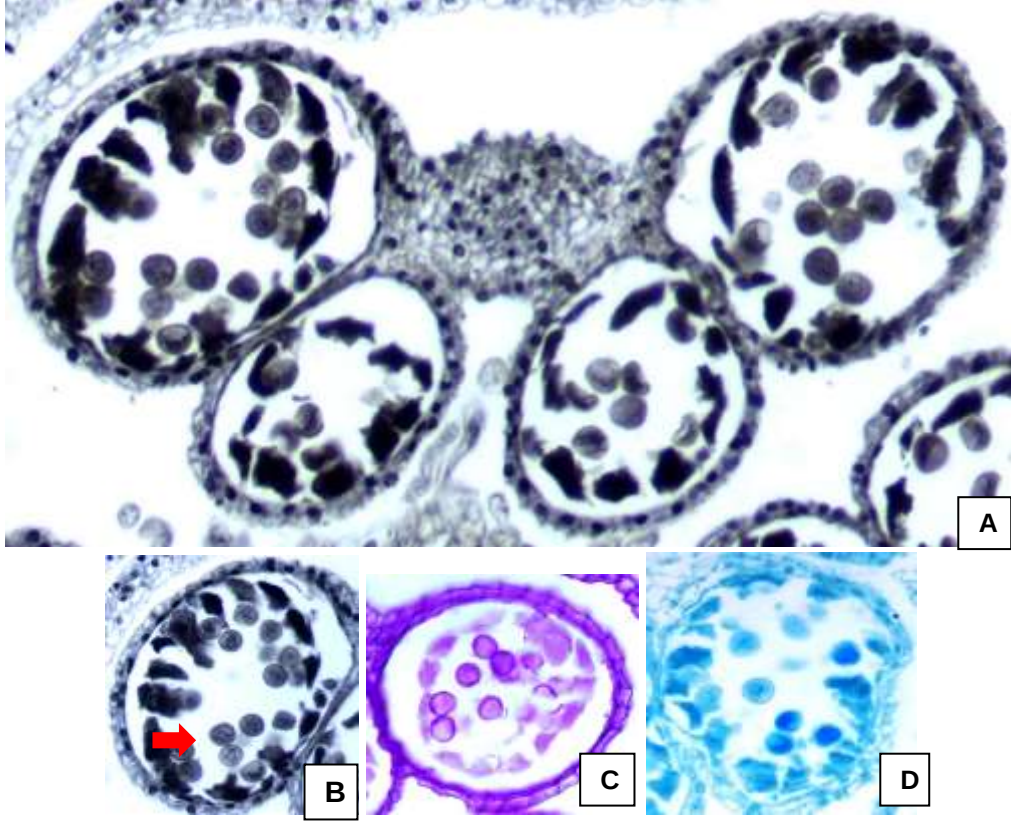
Şekil 4.3. A. SURES K2 AD SN 2/15 varyetesinde anter genel görünüşü. **B.** SURES K2 AD SN 2/15 varyetesinde çeper tabakaları ve tek nukleuslu mikrosporlar (ok). **C.** SURES K2 AD SN 2/15 varyetesinde PAS ile boyama sonucunda görülen çözünmeyen polisakkaritlerin birikimi. **D.** SURES K2 AD SN 2/15 varyetesinde Coomassie parlak mavisi ile boyama sonucunda görülen protein birikimi.



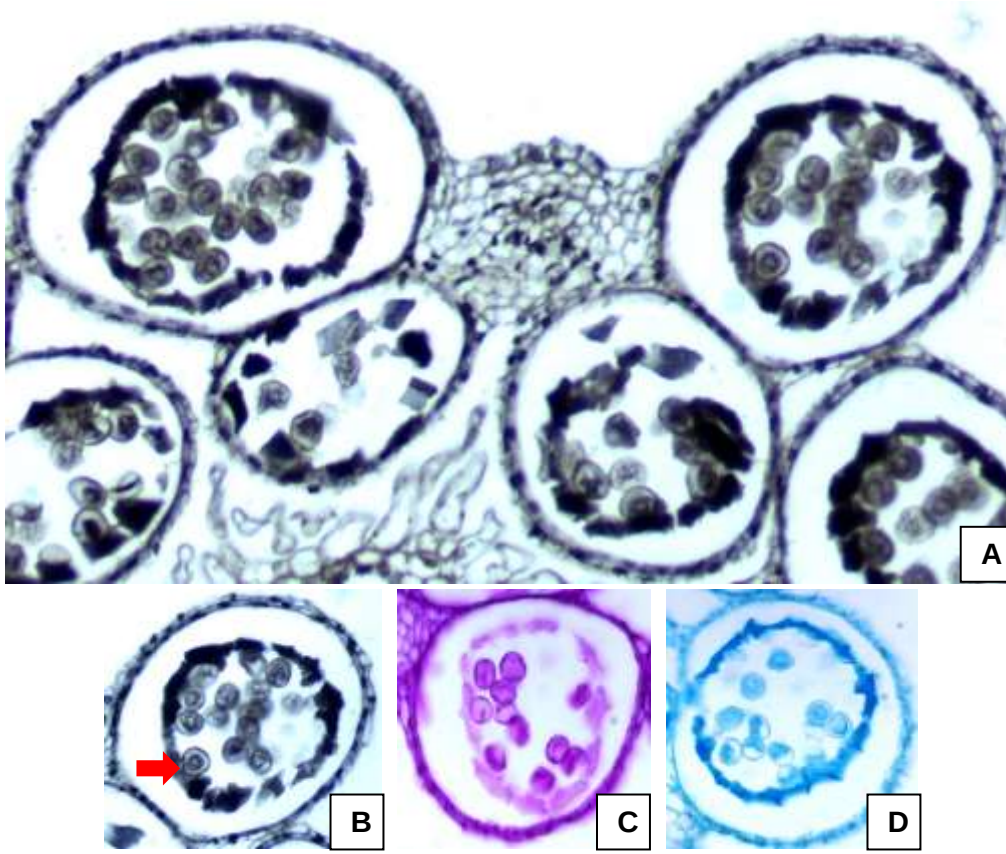
Şekil 4.4. **A.** IMI K2 R SN 7/15 varyetesinde anter genel görünüşü. **B.** IMI K2 R SN 7/15 varyetesinde çeper tabakaları ve tek nukleuslu mikrosporlar (ok). **C.** IMI K2 R SN 7/15 varyetesinde PAS ile boyama sonucunda görülen çözünmeyen polisakkaritlerin birikimi. **D.** IMI K2 R SN 7/15 varyetesinde Coomassie parlak mavisi ile boyama sonucunda görülen protein birikimi.



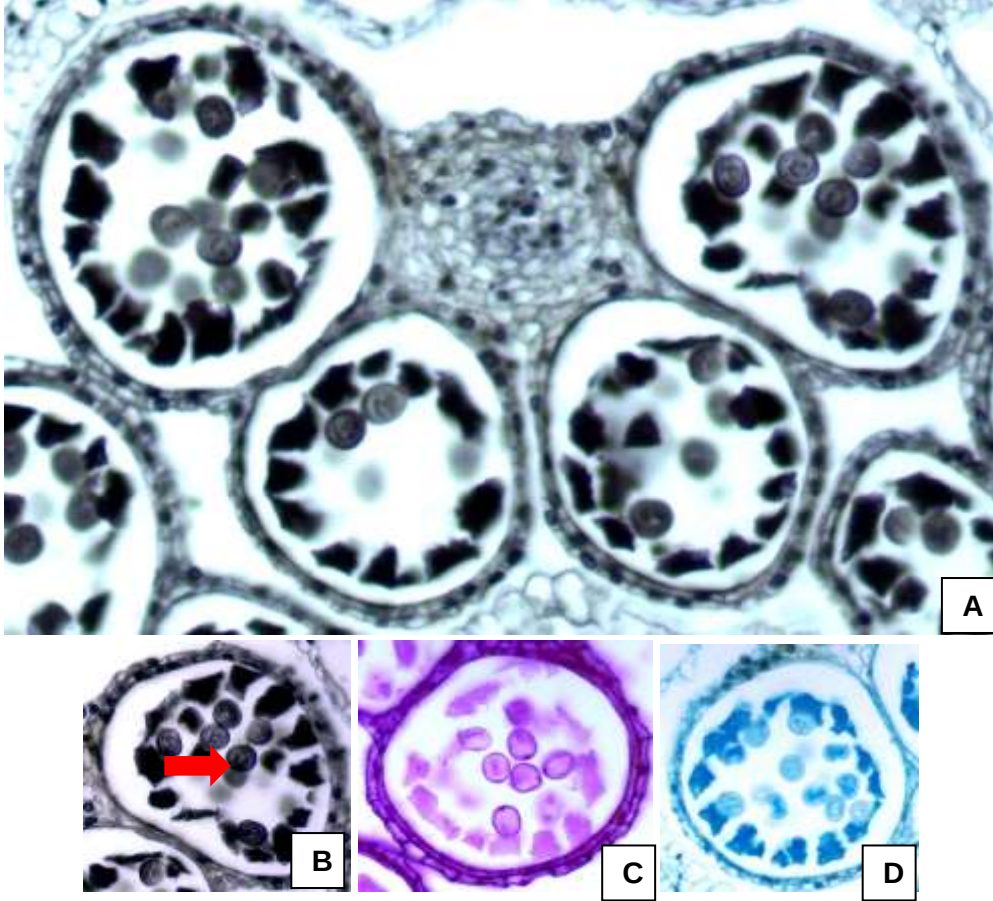
Şekil 4.5. A. IMI K2 AD SN 2/15 varyetesinde anter genel görünüşü. B. IMI K2 AD SN 2/15 varyetesinde çeper tabakaları ve tek nukleuslu mikrosporlar (ok). C. IMI K2 AD SN 2/15 varyetesinde PAS ile boyama sonucunda görülen çözünmeyen polisakkaritlerin birikimi. D. IMI K2 AD SN 2/15 varyetesinde Coomassie parlak mavisi ile boyama sonucunda görülen protein birikimi.



Şekil 4.6. **A.** SURES K2 R SN 9/15 varyetesinde anter genel görünüşü. **B.** SURES K2 R SN 9/15 varyetesinde çeper tabakaları ve tek nukleuslu mikrosporlar (ok). **C.** SURES K2 R SN 9/15 varyetesinde PAS ile boyama sonucunda görülen çözünmeyen polisakkaritlerin birikimi. **D.** SURES K2 R SN 9/15 varyetesinde Coomassie parlak mavisi ile boyama sonucunda görülen protein birikimi.

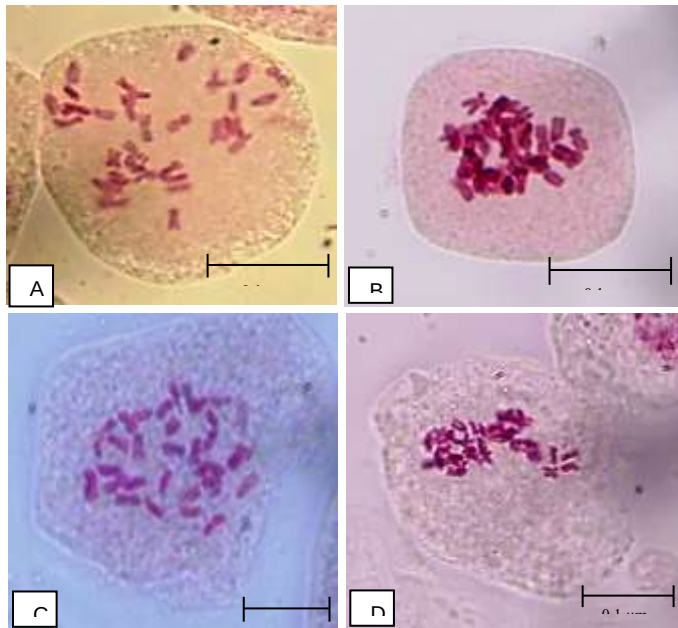


Şekil 4.7. **A.** IMI K2 R SN 25/15 varyetesinde anter genel görünüşü. **B.** IMI K2 R SN 25/15 varyetesinde çeper tabakaları ve tek nukleuslu mikrosporlar (ok). **C.** IMI K2 R SN 25/15 varyetesinde PAS ile boyama sonucunda görülen çözünmeyen polisakkaritlerin birikimi. **D.** IMI K2 R SN 25/15 varyetesinde Coomassie parlak mavisi ile boyama sonucunda görülen protein birikimi.



Şekil 4.8. **A.** IMI K2 R SN 22/15 varyetesinde anter genel görünüşü. **B.** IMI K2 R SN 22/15 varyetesinde çeper tabakaları ve tek nükleuslu mikrosporlar (ok). **C.** IMI K2 R SN 22/15 varyetesinde PAS ile boyama sonucunda görülen çözünmeyen polisakkaritlerin birikimi. **D.** IMI K2 R SN 22/15 varyetesinde Coomassie parlak mavisi ile boyama sonucunda görülen protein birikimi.

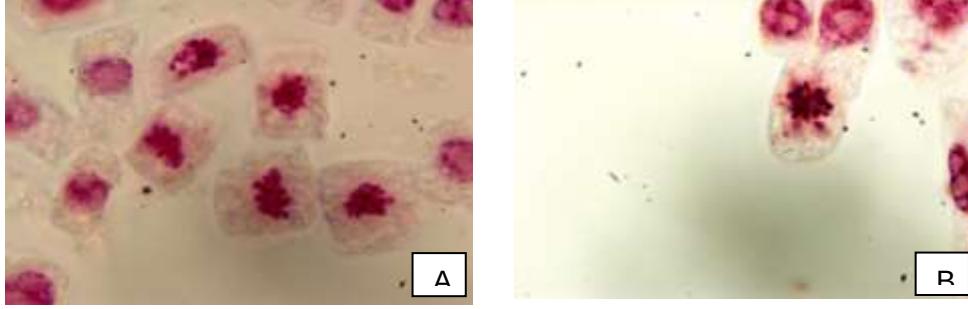
Kromozom Analizleri



Çalışmada kullanılan ve bitki yetiştirme odasında büyütülen örnekler ait kromozom analizi sonucunda tüm örneklerin $2n=34$ kromozoma sahip oldukları belirlendi.

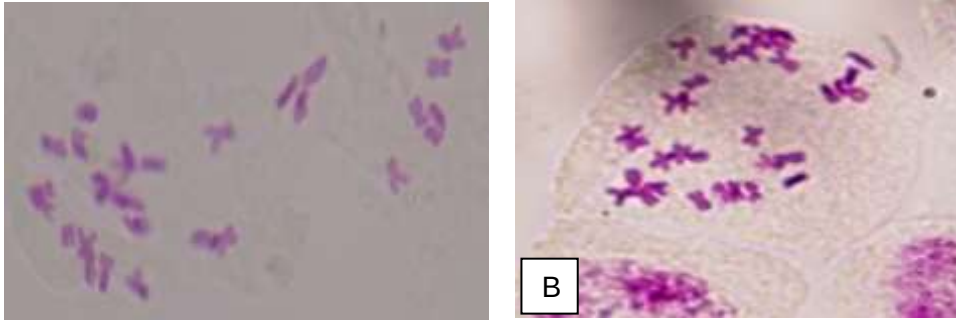
Şekil 4.9. IMI-K0-R-SN-7/13 (A), IMI-K3-R-SN-8/13 (B), SURES-K5-R-SN-4/13 (C) ve SURES-K0-A-SN-1/13 (D) örneklerinde kromozom analizleri. $2n=34$.

Farklı hibritlere ait tarla ayçiçeği örneklerinin köklerinden ezme preparat ve karyotip elde etmek amacıyla köklere uygulanan ön muamele metotlarından α -bromonaftalen ve buzlu su kromozomların dağılmayarak yapışkan yığınlar halinde gözlenmesine sebep oldu.



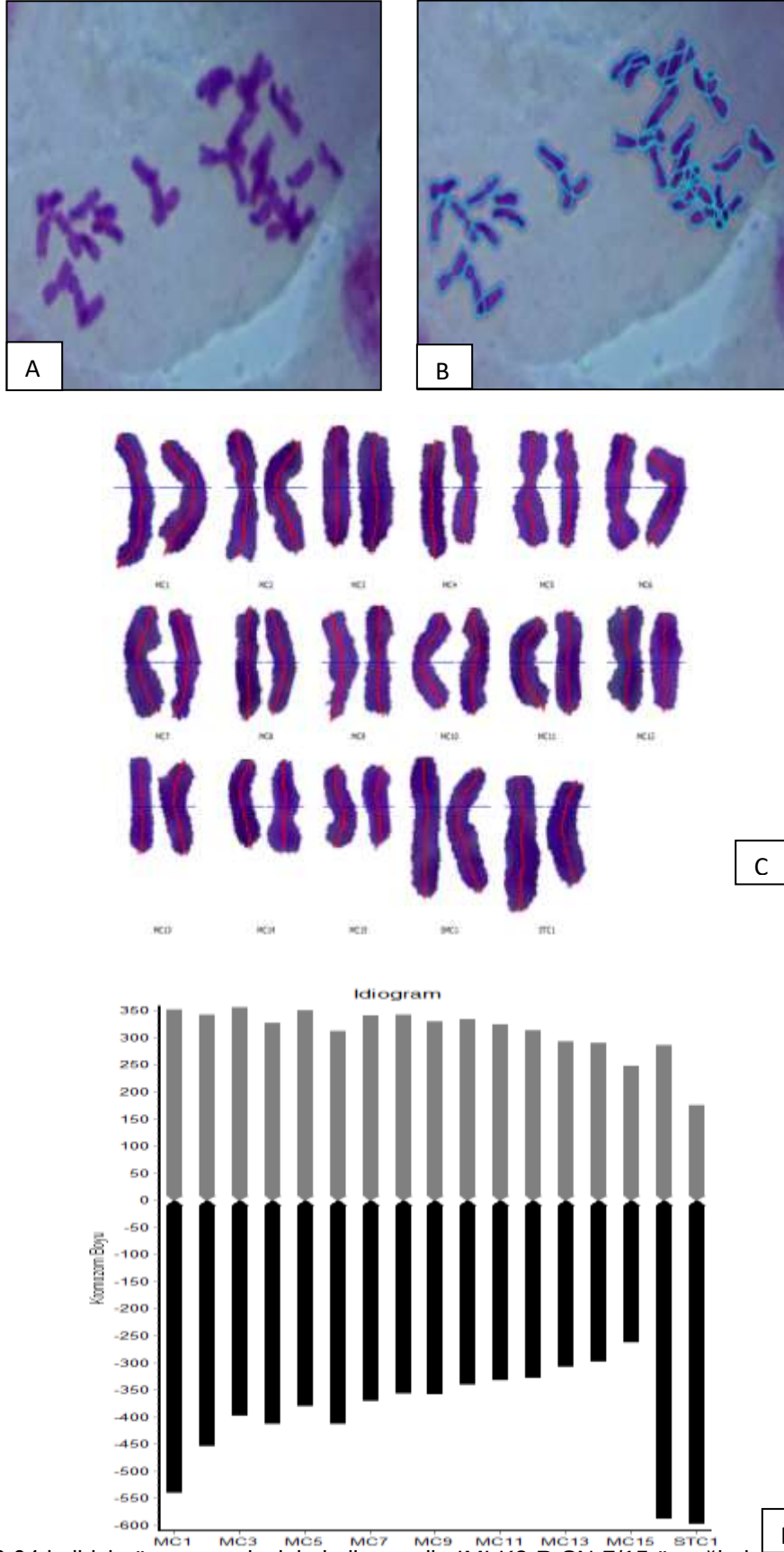
Şekil 4.10. α -bromonaftalen (A) ve buzlu su (B) ön uygulamalarının kullanımı ile gerçekleştirilen kromozom analizleri.

Ancak Cuellar ve ark. (1996) göre uygulanan %0,04 Kolhisin ön muamelesinin ayçiçeğinden ezme preparat ve karyotip çalışmalarına uygun kromozom görüntüleri verdiği belirlendi (**Şekil 4.11.**).

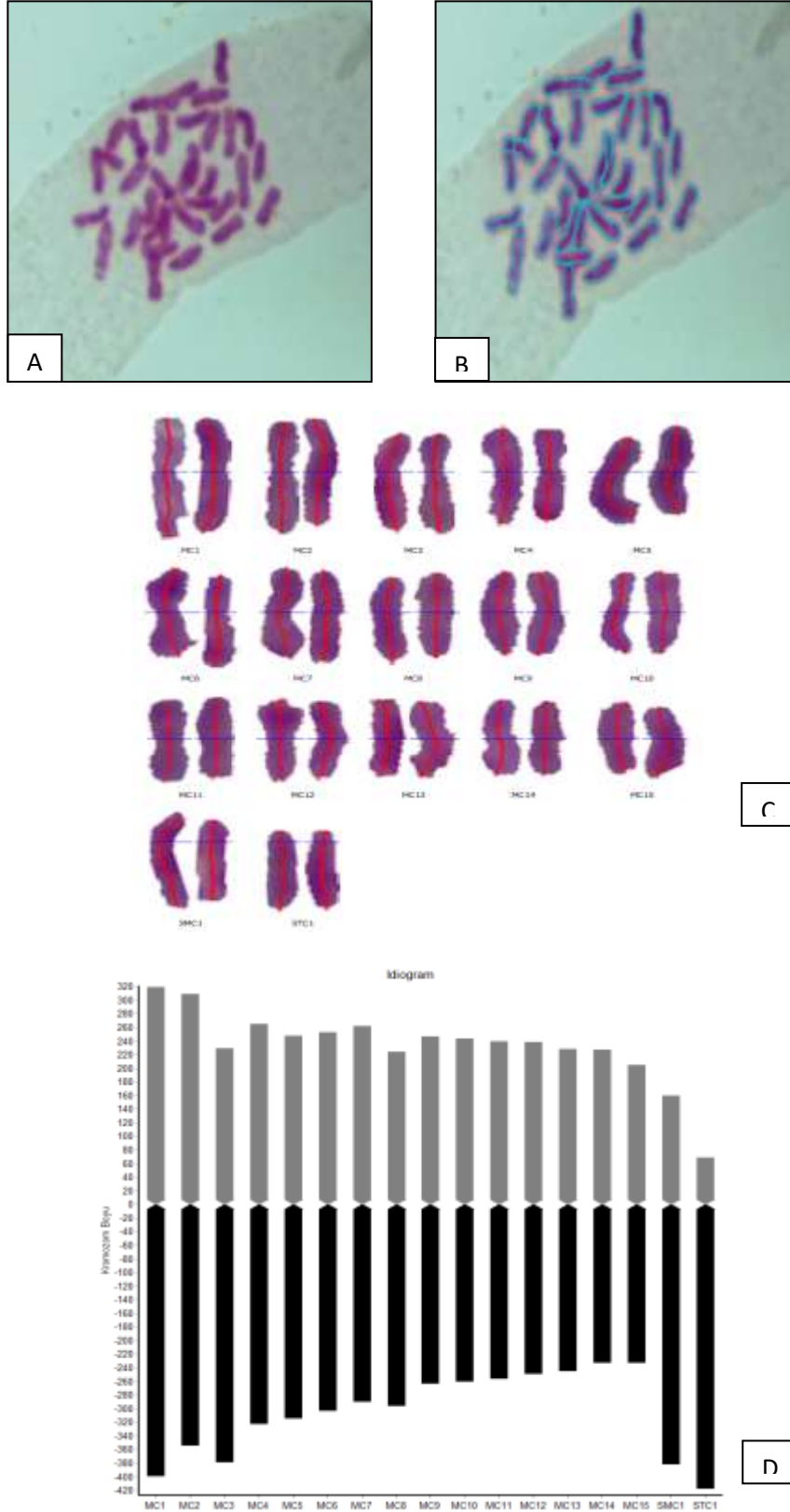


Şekil 4.11. %0,04 kolhisin ön muamelesinin kullanımı ile SURES-K2-AD-SN-2/15 (A) ve IMI-K2-R-SN-25/15 (B) örneklerinde ezme preparat yöntemi ile gerçekleştirilen kromozom analizleri ($2n=34$).

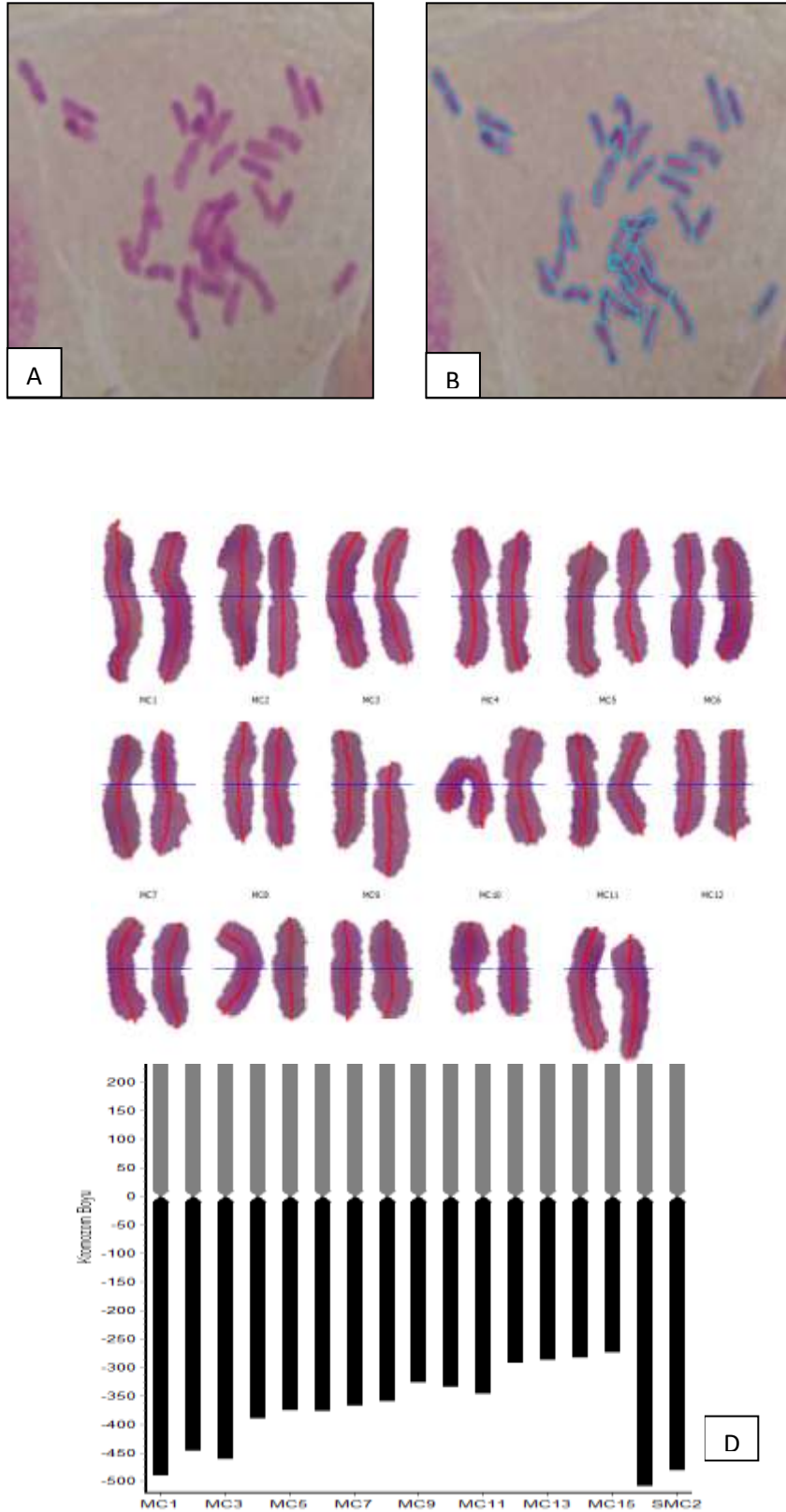
Hem bitki büyütme odasında hem de tarlada yetiştirilen örneklerde gerçekleştirilen kromozom analizlerinin optimizasyonu çalışmaları sonucunda %0,04 kolhisin ön muamelesinin kullanımı ile yapılan ezme preparat uygulamasının uygun olduğu görüldü ve bundan sonraki doku kültürü çalışmalarında elde edilecek haploid ve dihaploid bitkilerde de ilgili protokolün uygulanmasına karar verildi. Hem bitki yetiştirme odasında büyütülen örneklerde hem de tarlada yetiştirilen örneklere ait tohumlar çimlendirilerek elde edilen kök ucu dokuları kullanılarak gerçekleştirilen kromozom analizleri sonucunda tüm örneklerin $2n=34$ (diploid) oldukları, in vitro anter ve mikrospor kültürü çalışmalarına başlamadan önce doğrulanmış oldu. Ayrıca IMI-K2-R-SN-25/15 örneğinde %0,04 kolhisin ön muamelesinin kullanımı ile yapılan ezme preparat uygulamasından elde edilen metafaz kromozomları ile karyotip analizi de gerçekleştirildi (**Şekil 4.12-17.**). Bu amaçla Kameram yazılım programının “karyotip analizi” modülü kullanıldı.



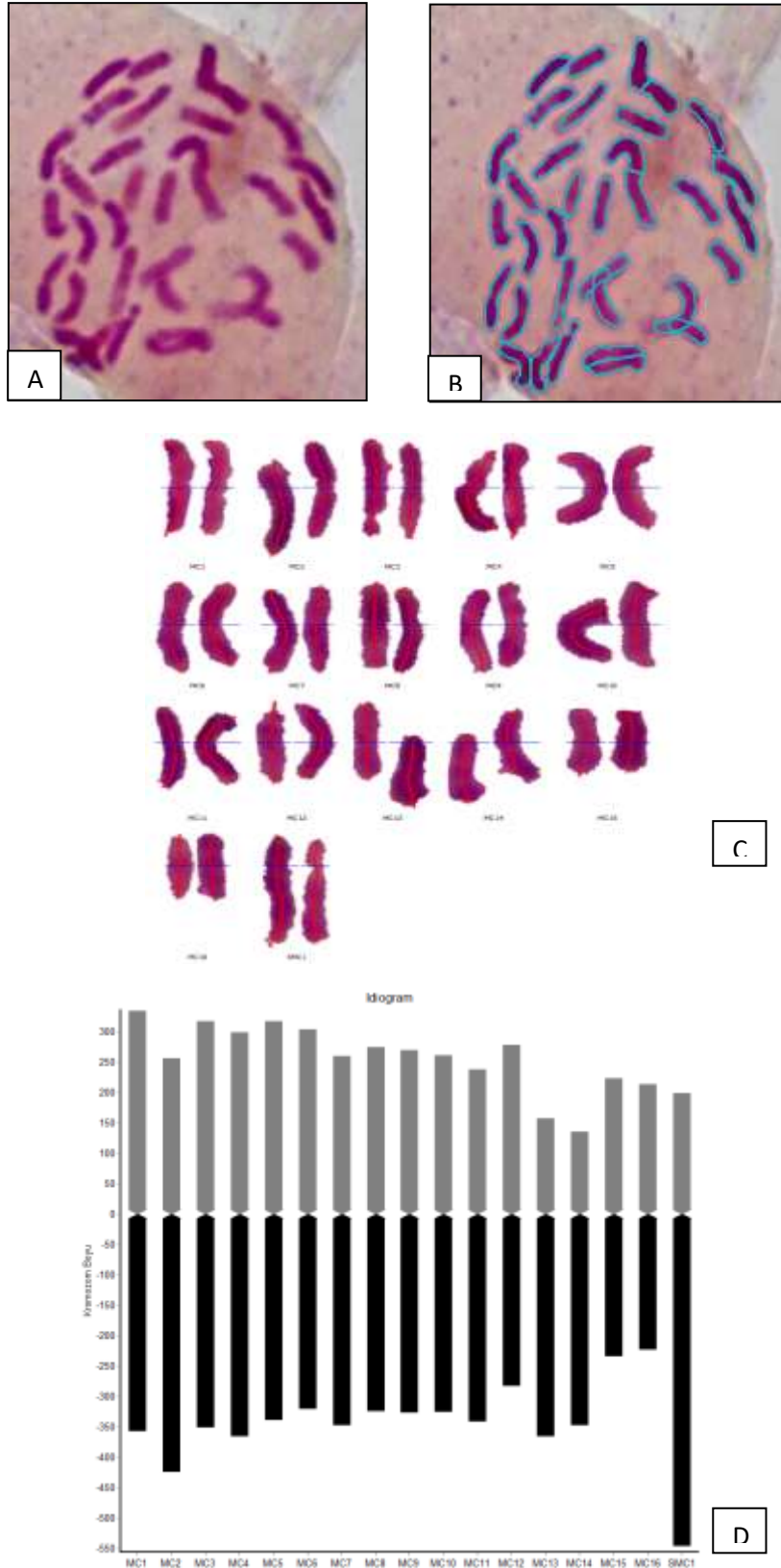
Şekil 4.12. %0,04 kolhisin ön muamelesinin kullanımı ile IMI-K2-R-SN-7/15 örneğinde karyotip analizi: A: Metafaz kromozomlarının eldesi, $2n=34$, B: Yazılım kullanılarak her bir kromozomun sınırlarının belirlenmesi, C: Kromozom kol, boy uzunluklarının ölçüm sonuçlarının değerlendirilmesi sonucu homolog kromozomların belirlenmesi (17 homolog kromozom çifti) ve karyogram eldesi, D: idiogram eldesi.



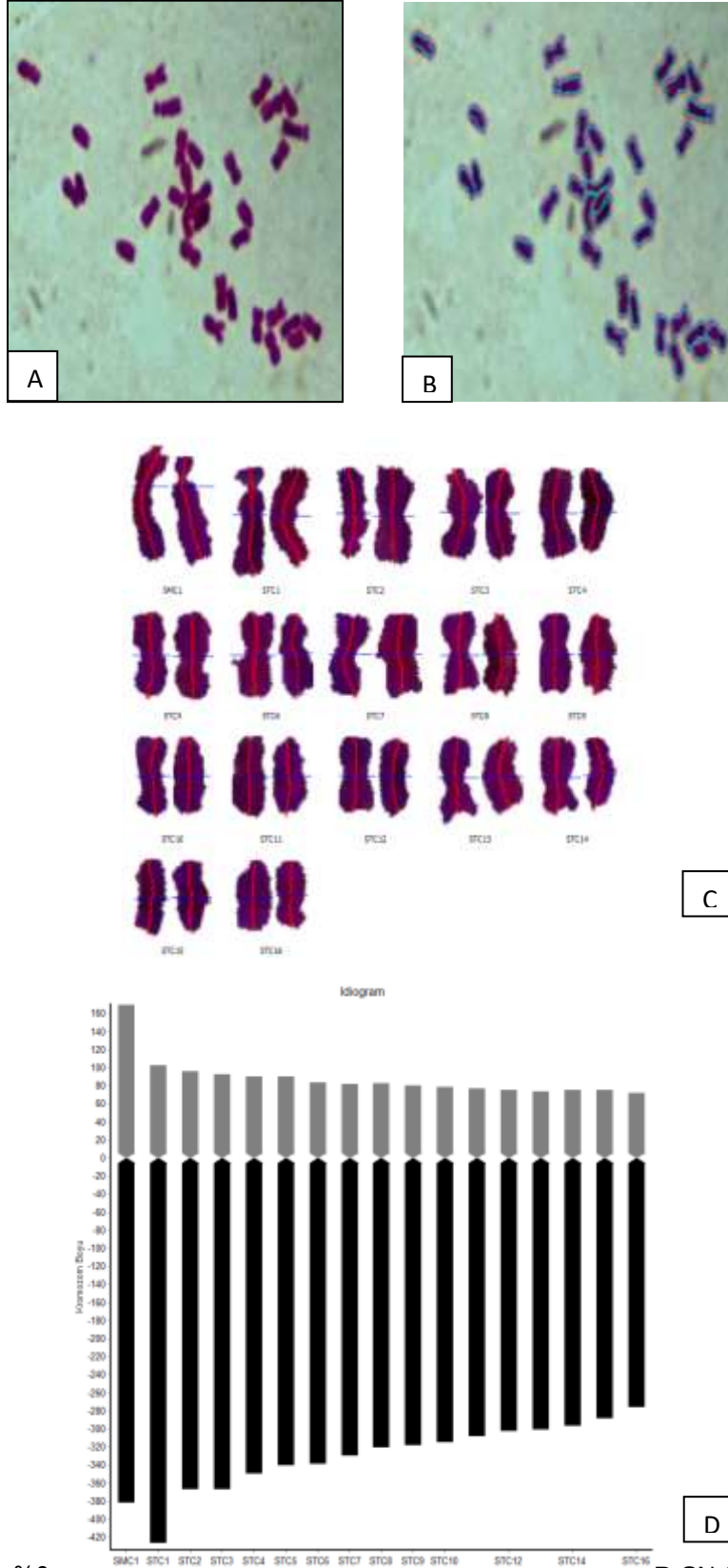
Şekil 4.13. %0,04 kolhisin ön muamelesinin kullanımı ile SURES-K2-R-SN-9/15 örneğinde karyotip analizi: A: Metafaz kromozomlarının eldesi, $2n=34$, B: Yazılım kullanılarak her bir kromozomun sınırlarının belirlenmesi, C: Kromozom kol, boy uzunluklarının ölçüm sonuçlarının değerlendirilmesi sonucu homolog kromozomların belirlenmesi (17 homolog kromozom çifti) ve karyogram eldesi, D: idiogram eldesi.



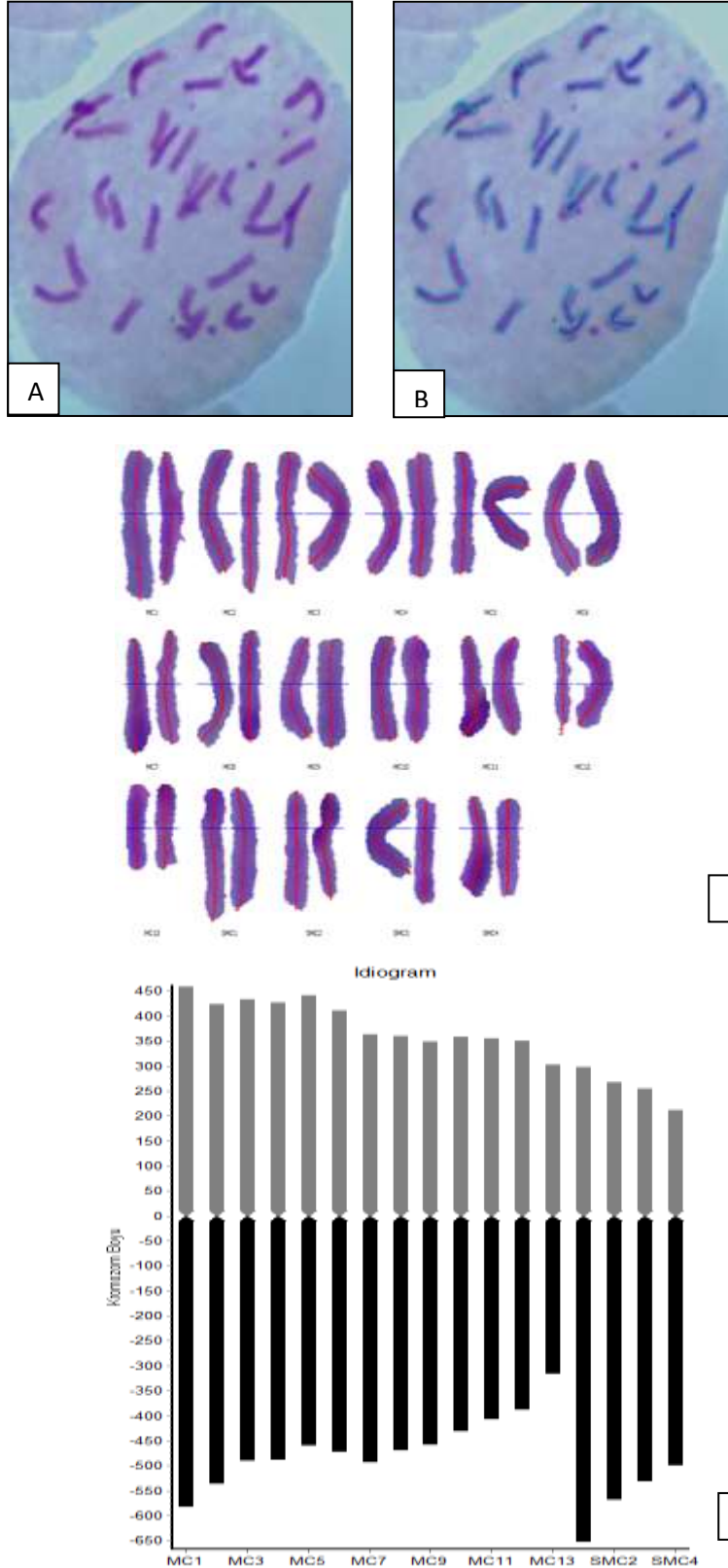
Şekil 4.14. %0,04 kolhisin ön muamelesinin kullanımı ile SURES-K2-AD-SN-2/15 örneğinde karyotip analizi: A: Metafaz kromozomlarının eldesi, $2n=34$, B: Yazılım kullanılarak her bir kromozomun sınırlarının belirlenmesi, C: Kromozom kol, boy uzunluklarının ölçüm sonuçlarının değerlendirilmesi sonucu homolog kromozomların belirlenmesi (17 homolog kromozom çifti) ve karyogram eldesi, D: idiogram eldesi.



Şekil 4.15. %0,04 kolhisin ön muamelesinin kullanımı ile IMI-K2-R-SN-25/15 örneğinde karyotip analizi: A: Metafaz kromozomlarının eldesi, $2n=34$, B: Yazılım kullanılarak her bir kromozomun sınırlarının belirlenmesi, C: Kromozom kol, boy uzunluklarının ölçüm sonuçlarının değerlendirilmesi sonucu homolog kromozomların belirlenmesi (17 homolog kromozom çifti) ve karyogram eldesi, D: idiogram eldesi.



Şekil 4.16. %0,04 kolhisin on muamelesinin kullanımı ile İMİ-K2-R-SN-22/15 örneğinde karyotip analizi: A: Metafaz kromozomlarının eldesi, **2n=34**, B: Yazılım kullanılarak her bir kromozomun sınırlarının belirlenmesi, C: Kromozom kol, boy uzunluklarının ölçüm sonuçlarının değerlendirilmesi sonucu homolog kromozomların belirlenmesi (17 homolog kromozom çifti) ve karyogram eldesi, D: idiogram eldesi.



Şekil 4.17. %0,04 kolhisin ön muamelesinin kullanımı ile IMI-K2-AD-SN-2/15 örneğinde karyotip analizi: A: Metafaz kromozomlarının eldesi, $2n=34$, B: Yazılım kullanılarak her bir kromozomun sınırlarının belirlenmesi, C: Kromozom kol, boy uzunluklarının ölçüm sonuçlarının değerlendirilmesi sonucu homolog kromozomların belirlenmesi (17 homolog kromozom çifti) ve karyogram eldesi, D: idiogram eldesi.

Bitki Yetiştirme Odası Koşulları

Ayrı ayrı genotiplerin farklı ön uygulamalar ve oksin çeşitleriyle androgenez üzerindeki etkisini saptamak amacıyla oluşan kallus sayısı, embriyojenik kallus sayısı, rejenerasyonun varlığı, yüzde kallus ve yüzde embriyojenik kallus parametreleri değerlendirilmiştir (**Tablo 4.1,2.**).

Tablo 4.1. Farklı dört genotipe ait anterlerin farklı zaman aralıklarında sıcak uygulamaya (+35 °C) tabi tutulup değişik oksin çeşidi içeren 3 çeşit besi ortamına alındıktan sonraki ortalama anter, kallus, embriyojenik kallus, % kallus, % embriyojenik kallus rejenerasyon miktarı (%kallus=kallus sayısı/anter sayısı, %embriyojenik kallus=embriyojenik kallus sayısı/kallus sayısı) (Tüm embriyojenik kalluslar MS4 besin ortamına alınmıştır).

Uygulama	Genotip	Hormon	Anter	Kallus	% Kallus	Embr. kallus	% Embr. kallus	Rejenerasyon	Rej. yapısı	% Rej.
2 GÜN SICAK UYGULAMA	G1	MS2	28	18	64	3	17	0		0
		MS1	28	24	86	8	33	1	Yaprak	13
		MS3	28	18	64	9	50	0		0
	G2	MS2	31	22	71	8	36	0		0
		MS1	31	23	74	1	4	0		0
		MS3	31	8	26	0	0	0		0
	G3	MS2	9	8	89	1	13	0		0
		MS1	9	7	78	3	43	1	Gövde	33
		MS3	9	6	67	0	0	0		0
	G4	MS2	12	5	42	2	40	0		0
		MS1	12	8	67	3	38	0		0
		MS3	12	10	83	0	0	0		0
4 GÜN SICAK UYGULAMA	G1	MS2	33	23	70	8	35	0		0
		MS1	33	24	73	8	33	1	Yaprak	13
		MS3	33	27	82	11	41	2	Yaprak	18
	G2	MS2	32	19	59	6	32	0		0
		MS1	32	25	78	2	8	0		0
		MS3	32	9	28	1	11	0		0
	G3	MS2	32	20	63	1	5	1	Yaprak	100
		MS1	32	19	59	6	32	0		0
		MS3	32	25	78	9	36	0		0
	G4	MS2	31	17	55	9	53	0		0
		MS1	31	15	48	3	20	0		0
		MS3	31	18	58	6	33	0		0
8 GÜN SICAK UYGULAMA	G1	MS2	20	10	50	3	30	0		0
		MS1	20	20	100	6	30	1	Yaprak	17
		MS3	20	6	30	2	33	0		0
	G2	MS2	28	6	21	2	33	0		0
		MS1	28	21	75	3	14	0		0

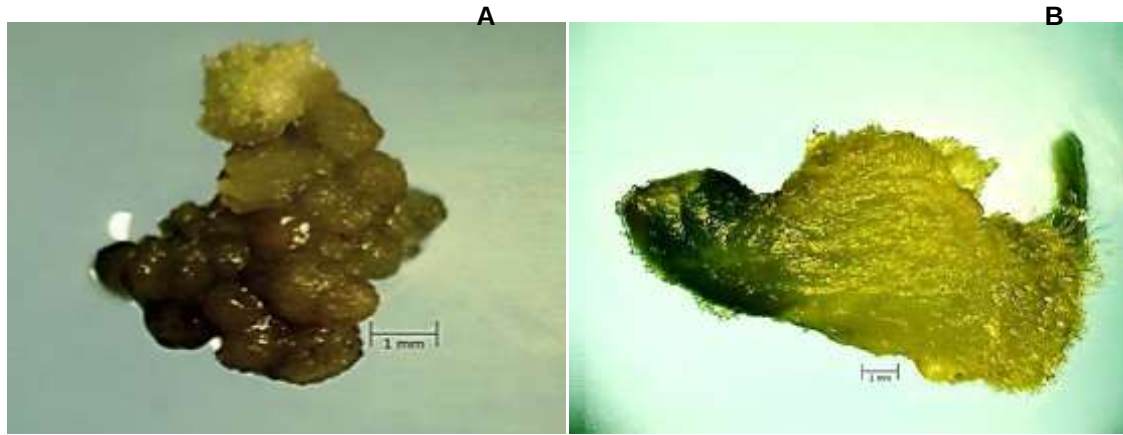
		MS3	28	8	29	3	38	0		0
	G3	MS2	12	8	67	2	25	0		0
		MS1	12	10	83	4	40	0		0
		MS3	12	8	67	2	25	0		0
	G4	MS2	30	24	80	18	75	0		0
		MS1	30	21	70	8	38	1	Yaprak	13
		MS3	30	24	80	7	29	0		0
12 GÜN SICAK UYGULAMA	G1	MS2	20	8	40	2	25	0		0
		MS1	20	8	40	3	38	0		0
		MS3	20	6	30	3	50	1	Yaprak	33
	G2	MS2	32	22	69	7	32	0		0
		MS1	32	19	59	1	5	0		0
		MS3	32	15	47	2	13	0		0
	G3	MS2	32	23	72	12	52	1	Yaprak	8
		MS1	32	19	59	10	53	1	Yaprak	10
		MS3	22	10	45	1	10	0		0
	G4	MS2	12	10	83	2	20	1	Yaprak	50
		MS1	22	13	59	6	46	2	Yaprak	33
		MS3	22	15	68	2	13	1	Yaprak	50

Tablo 4.2. Farklı dört genotipe ait anterlerin farklı zaman aralıklarında soğuk uygulamaya (+4 °C) tabi tutulup değişik oksin çeşidi içeren 3 çeşit besin ortamına alındıktan sonraki ortalama anter, kallus, embriyojenik kallus, % kallus, % embriyojenik kallus ve rejenerasyon miktarı (%kallus=kallus sayısı/anter sayısı, %embriyojenik kallus=embriyojenik kallus sayısı/kallus sayısı) (Tüm embriyojenik kalluslar MS4 besin ortamına alınmıştır).

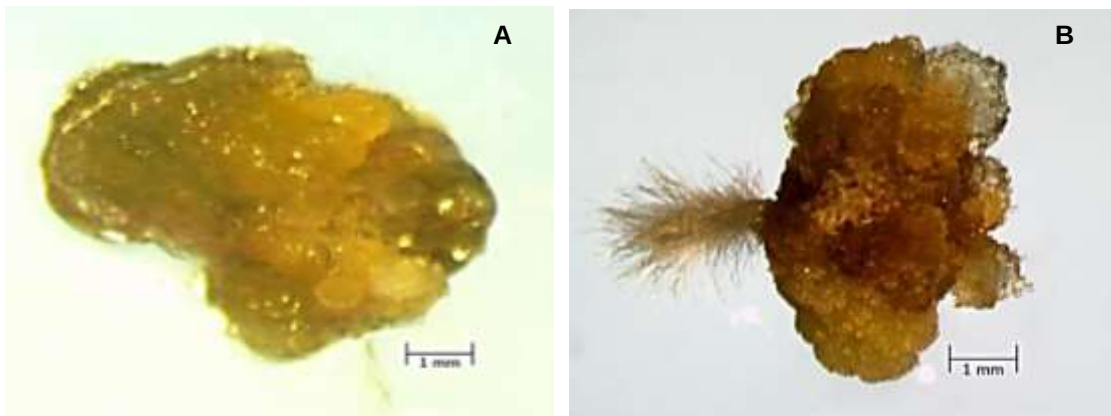
Uygulama	Genotip	Hormon	Anter	Kallus	% Kallus	Embr. kallus	% Embr. kallus	Rejenerasyon	Rej. yapısı	% Rej.
24 SAAT SOĞUK UYGULAMA	G1	MS2	32	15	47	4	27	1	Yaprak	25
		MS1	32	9	28	6	67	0		0
		MS3	32	8	25	1	13	1	Yaprak	100
	G2	MS2	33	29	88	0	0	0		0
		MS1	33	27	82	0	0	0		0
		MS3	33	0	0	0	0	0		0
	G3	MS2	30	25	83	16	64	0		0
		MS1	30	27	90	15	56	2	Yaprak	13
		MS3	30	12	40	1	8	0		0
	G4	MS2	38	25	66	5	20	0		0
		MS1	38	25	66	0	0	0		0
		MS3	38	14	37	4	29	0		0
48 SAAT SOĞUK UYGULAMA	G1	MS2	29	24	83	9	38	0		0
		MS1	34	20	59	6	30	0		0
		MS3	28	15	54	1	7	0		0
	G2	MS2	33	25	76	0	0	0		0
		MS1	33	14	42	2	14	0		0
		MS3	33	5	15	1	20	0		0
	G3	MS2	32	22	69	15	68	0		0
		MS1	34	22	65	11	50	1	Yaprak	9
		MS3	34	15	44	5	33	0		0
	G4	MS2	8	5	63	0	0	0		0
		MS1	8	5	63	2	40	0		0
		MS3	8	5	63	0	0	0		0
SAA T SOĞ UK UYG	G1	MS2	32	12	38	5	42	0		0
		MS1	32	13	41	2	15	0		0

		MS3	32	9	28	1	11	0		0
	G2	MS2	11	9	82	3	33	0		0
		MS1	11	0	0	0	0	0		0
		MS3	11	0	0	0	0	0		0
	G3	MS2	31	26	84	3	12	0		0
		MS1	31	0	0	5	0	2	Gövde	40
		MS3	31	12	39	0	0	0		0
	G4	MS2	31	23	74	12	52	0		0
		MS1	31	19	61	10	53	0		0
		MS3	31	6	19	4	67	0		0

Yapılan çalışmalar esnasında kültür ortamına alınan anterlerin ilk haftanın bitiminden itibaren kallus oluşturmaya başladıkları saptanmıştır. Bu kallusların bir kısmı embriyogenik yapıda olmasına rağmen bir kısmı ise kompakt, düz kallus yapısına sahiptir. Embriyogenik kalluslar globüler yapıda embriyoidler içerip dağılan kumsu bir yapıya sahipken embriyojenik olmayan kalluslar kompakt ya da süngerimsi yapıdadırlar. Embriyogenik kallusların bir kısmı yaklaşık bir ayın sonunda rejenerasyon yanıtı vermiştir (**Şekil 4.18-22**).



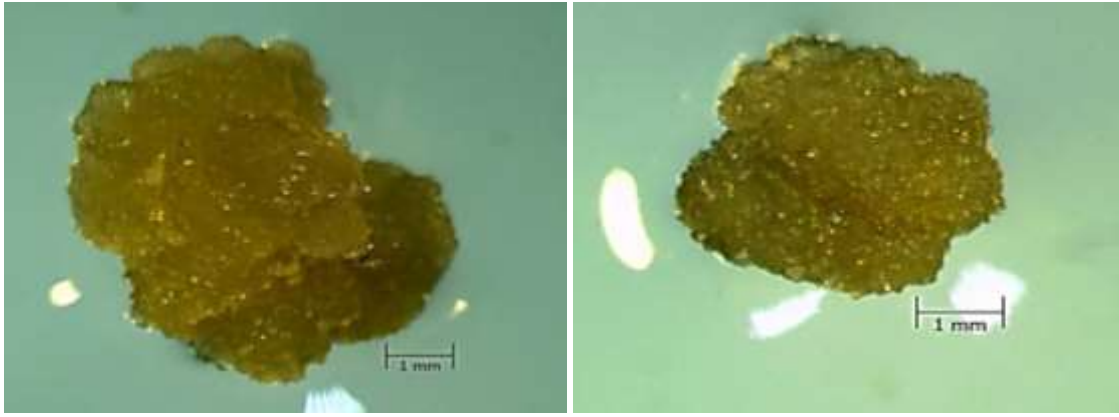
Şekil 4.18. İMİ K2 AD SN 2/15 genotipinden gelişen embriyogenik kallus (A) , gövde rejenerasyon (B).



Şekil 4.19. İMİ K2 R SN 7/15 genotipinden gelişen embriyogenik kallus (A), kök rejenerasyonu (B).



Şekil 4.20. İMİ K2 R SN 22/15 genotipinden gelişen embriyogenik kallus (A, B).

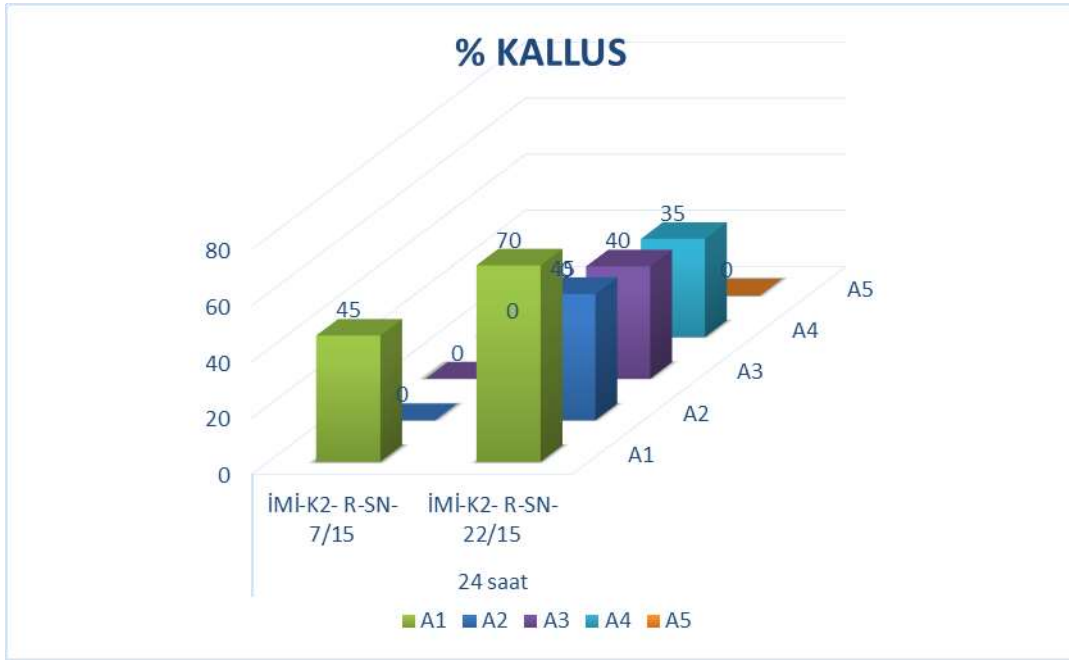


Şekil 4.21. İMİ K2 R SN 25/15 genotipinden gelişen embriyogenik kallus (A), SURES K2 AD SN 2/15 genotipinden gelişen embriyogenik kallus (B).

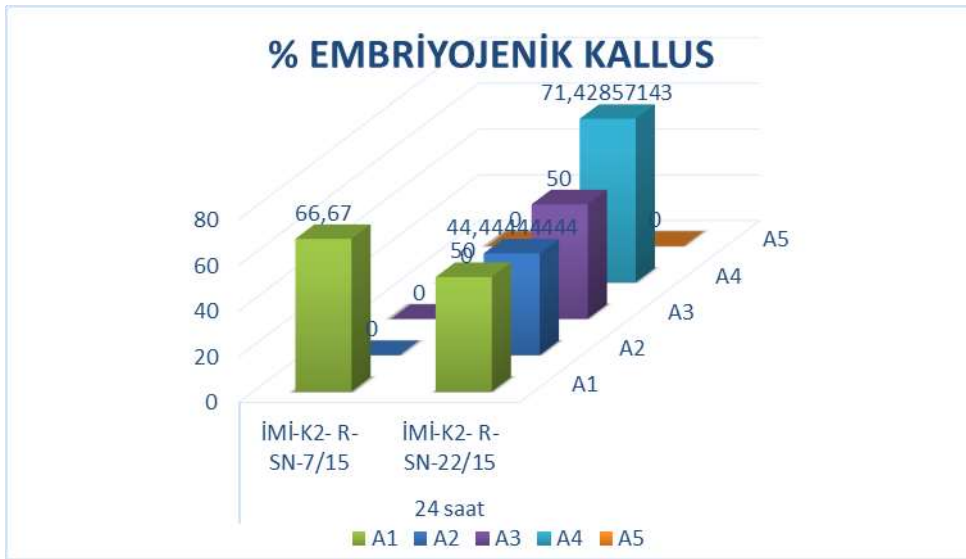


Şekil 4.22. SURES K2 R SN 9/15 genotipinden gelişen embriyogenik kallus.

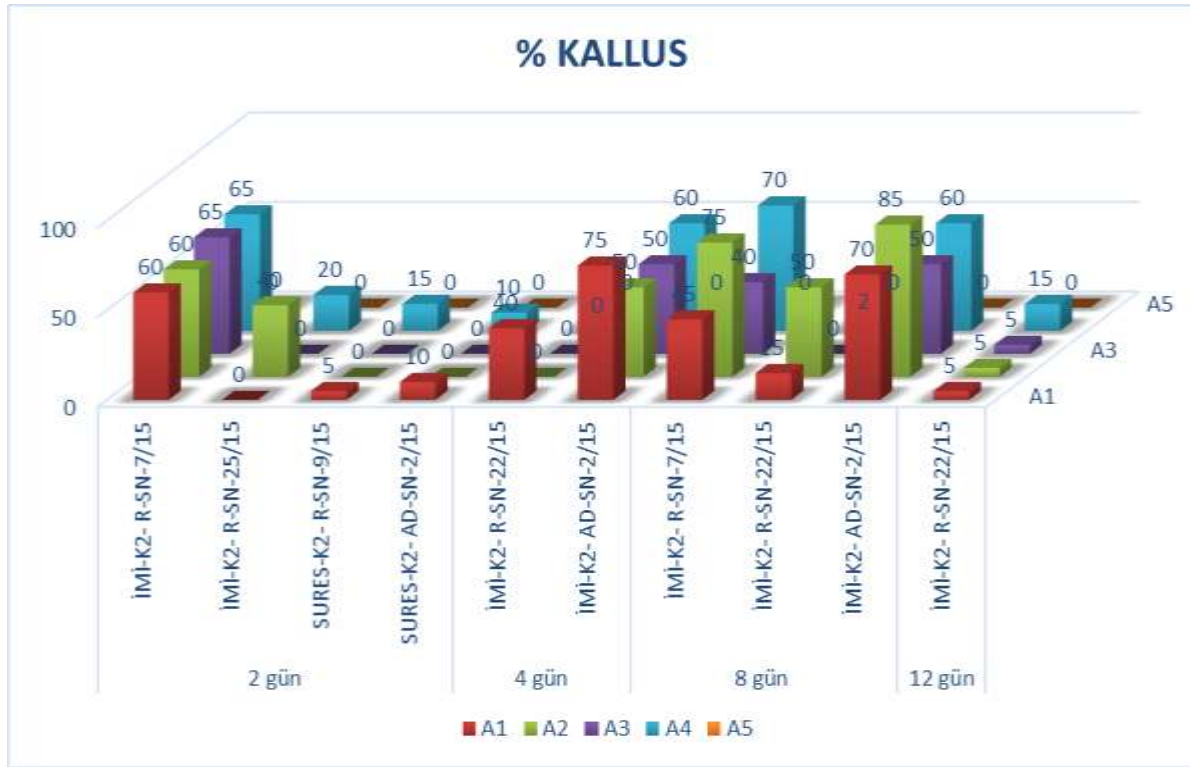
Ön uygulamaların % kallus ve % embriyogenik kallus değerleri üzerine etkileri **Şekil 4.23-26**'da verilmiştir.



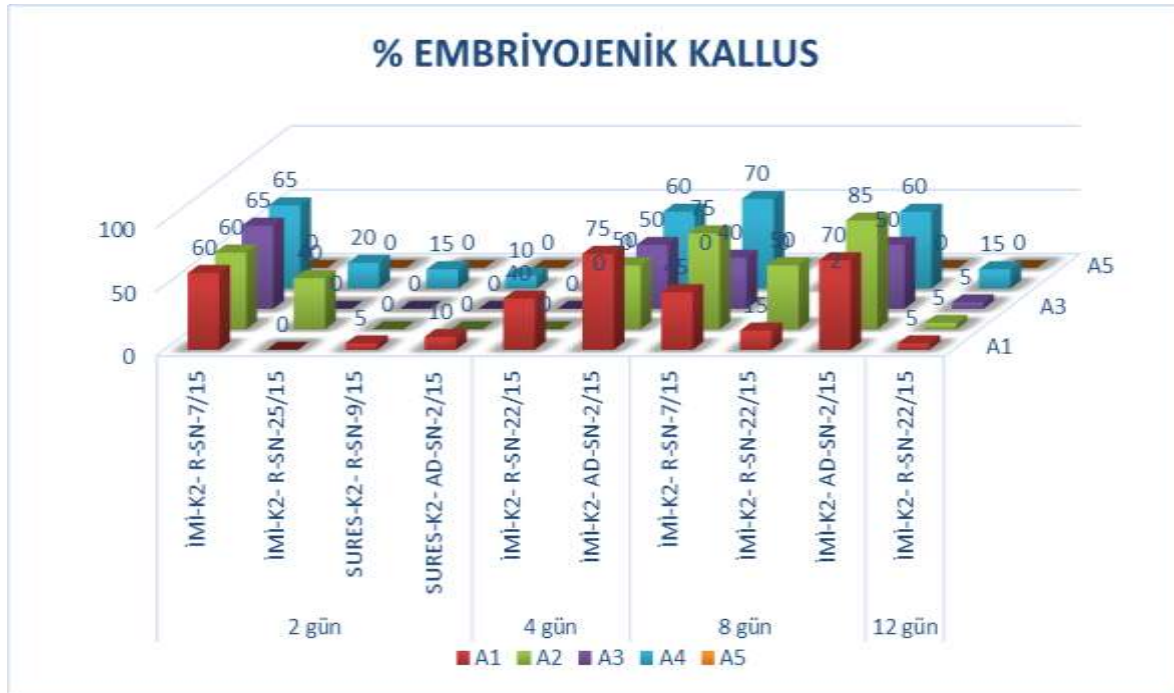
Şekil 4.23. Soğuk uygulama ile genotip ve besiyeri içeriklerinin % kallus eldesi üzerine etkisi.



Şekil 4.24. Soğuk uygulama ile genotip ve besiyeri içeriklerinin % kallus eldesi üzerine etkisi.

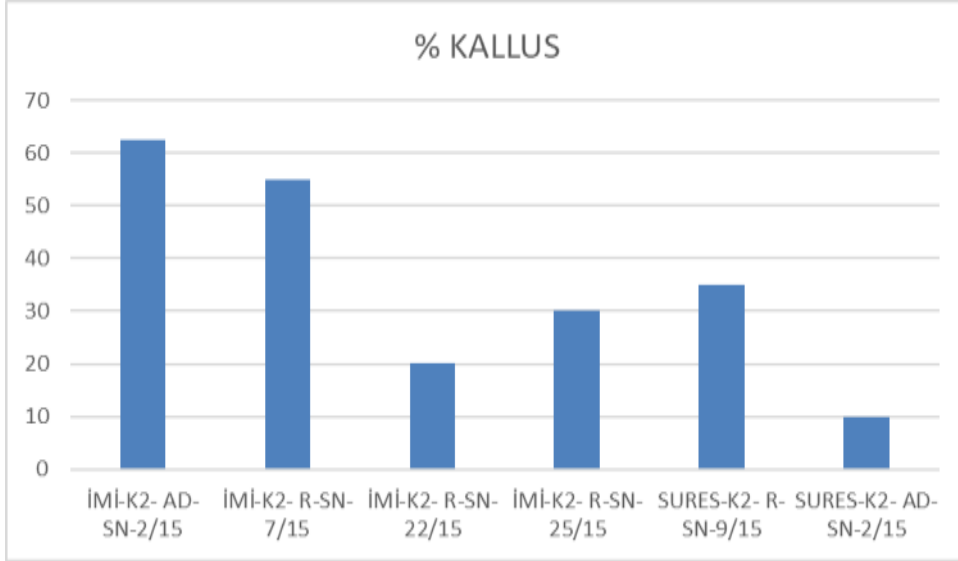


Şekil 4.25. Sıcak uygulama ile genotip ve farklı besiyeri içeriklerinin % kallus eldesi üzerine etkisi.

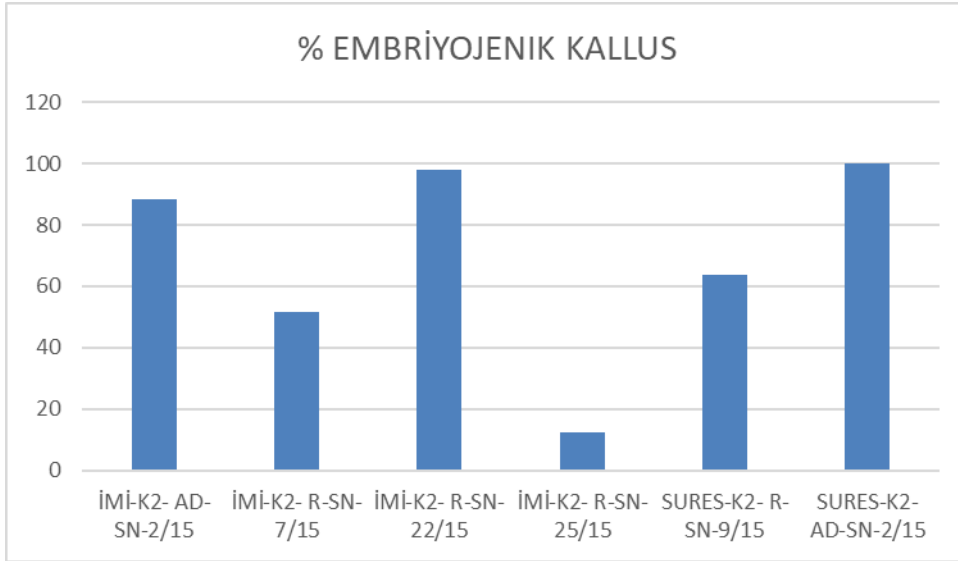


Şekil 4.26. Sıcak uygulama ile genotip ve besiyeri içeriklerinin % embriyogenik kallus eldesi üzerine etkisi.

Tüm uygulamalarda genotiplere göre elde edilen % kallus ve % embriyogenik kallus değerleri **Şekil 4.27, 28**'de verildi.

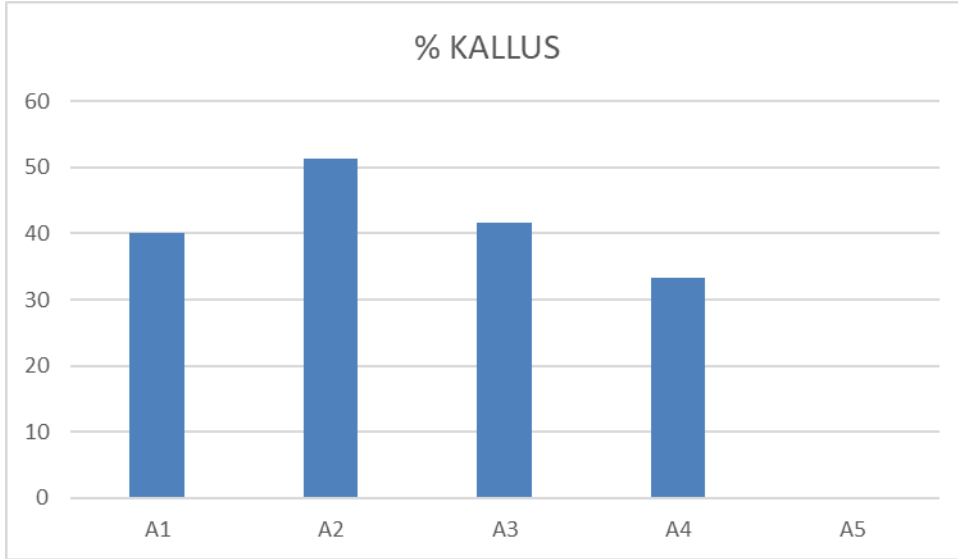


Şekil 4.27. Tüm uygulamalarda genotiplere göre elde edilen % kallus oranları.

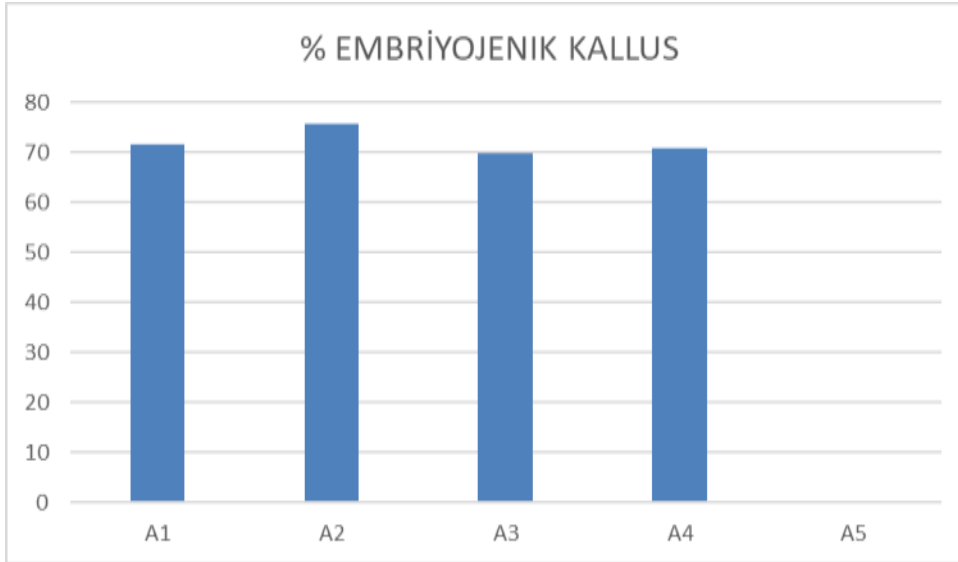


Şekil 4. 28. Tüm uygulamalarda genotiplere göre elde edilen % embriyogenik kallus oranları.

Tüm uygulamalarda besiyeri içeriğine göre elde edilen % kallus ve % embriyogenik kallus değerleri **Şekil 4.29,30**'de verildi.



Şekil 4.29. Tüm uygulamalarda besiyeri içeriğine göre elde edilen % kallus oranları.



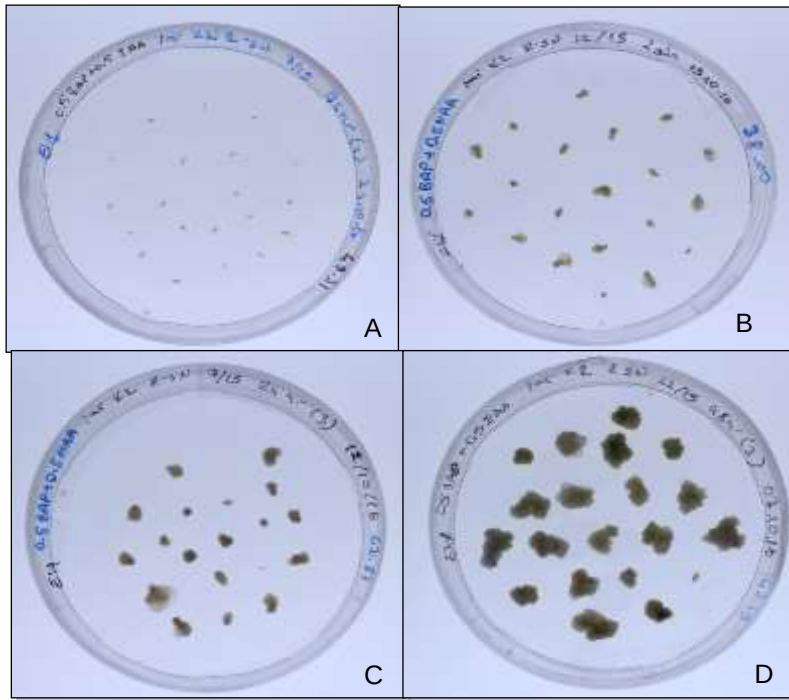
Şekil 4.30. Tüm uygulamalarda besiyeri içeriğine göre elde edilen % embriyogenik kallus oranları.

Yapılan çalışmalar sonucunda en iyi kallus yüzdesini (51,25) A2 besiyeri verirken, bunu 41,66 oranla A3 besiyeri takip etmiştir. En iyi embriyogenik kallus yüzdesini (%75,63) yine A1 besiyeri verirken, bunu %71,62 oranla A1 besiyeri takip etmiştir. A5 besiyerinde ise tüm uygulamalarda kallus oluşumu gözlenmemiştir. Genotip baz alarak bakıldığında ise en iyi kallus yüzdesini (%62,5) İMİ-K2- AD-SN-2/15 genotipi verirken bunu %55 oranla İMİ-K2-R-SN-7/15 genotipi takip etmiştir. En iyi embriyogenik kallus yüzdesini (%100) SURES-K2-AD-SN-2/15 genotipi verirken bunu %98 oranla İMİ-K2- R-SN-22/15 genotipi takip etmiştir.

Tarla Koşulları

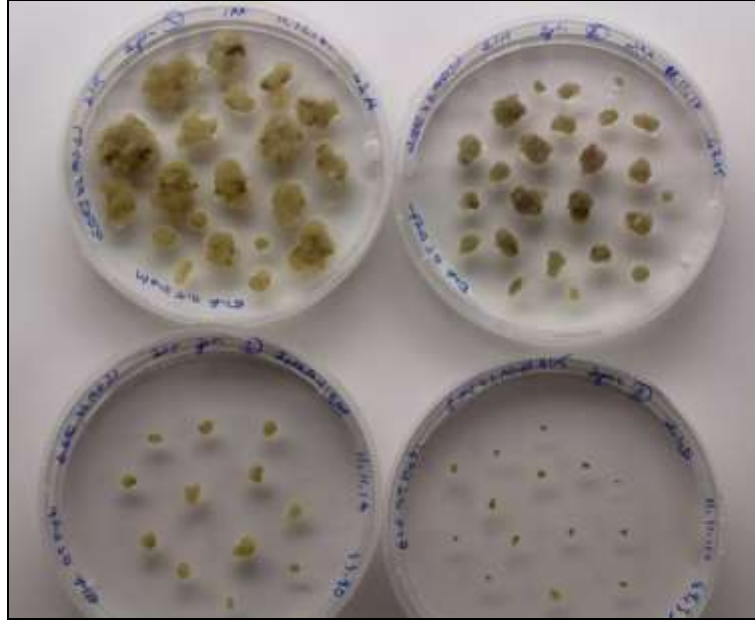
Altı farklı genotip (İMİ K2 R SN 7/15, İMİ K2 R SN 22/15, İMİ K2 R SN 25/15, İMİ K2 AD SN 2/15, SURES K2 R SN 9/15 ve SURES K2 AD SN 2/15), 7 farklı ön uygulaması (2 gün 35°C, 4 gün 35°C, 8 gün 35°C, 12 gün 3°C, 24 saat 4°C, 48 saat 4°C ve 72 saat 4°C) ve 4 farklı besin ortamı uygulaması (0.5 mg/L BAP+ 0.5 mg/L NAA, 0.5 mg/L BAP+ 0.5 mg/L IAA, 0.5 mg/L BAP+ 0.5 mg/L 2,4D, 1 mg/L BAP+ 2 mg/L NAA) ile yapılan anter kültürü çalışmaları sonucunda elde edilen androenez uyartımları incelenerek besin ortamlarına ekilen anter sayısı, oluşan kallus sayısı, embriyogenik olan ve embriyogenik olmayan kallus değerleri kaydedildi.

Yapılan çalışmalar esnasında kültür ortamına alınan anterlerin ilk haftanın bitiminden itibaren kallus oluşturmaya başladıkları gözlemlenmiştir (**Şekil 4.31.**).



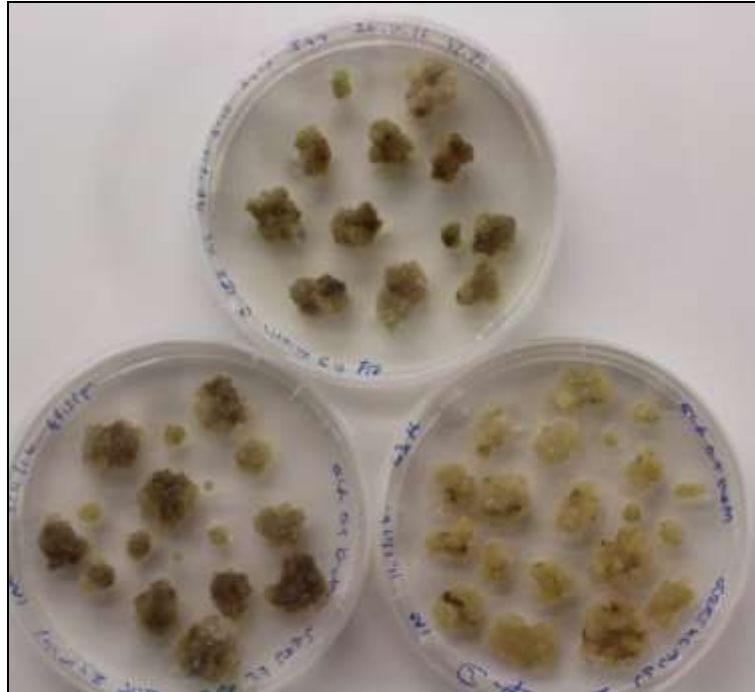
Şekil 4.31. 11 günlük kallus (A),16 günlük kallus(B),23 günlük kallus (C),28 günlük kallus (D).

Bu kallusların bir kısmı embriyogenik yapıda olmasına rağmen bir kısmı ise opak, düz kallus yapısına sahiptir. Embriyogenik kalluslar globüler yapıda embriyoidler içerip dağılan kumsu bir yapıya sahipken embriyogenik olmayan kalluslar kompakt ya da süngerimsi yapıdadırlar. Embriyogenik kallusların bir kısmı yaklaşık bir ayın sonunda rejenerasyon yanıtı vermiştir. Ekildikten sonra gelişimleri gözlenen kültürlerde; A2 anterlerden gelişen kallusların diğer hormon kombinasyonlarını içeren besiyerlerindeki kalluslara göre daha geç geliştiği gözlemlenmiştir (**Şekil 4.32.**).



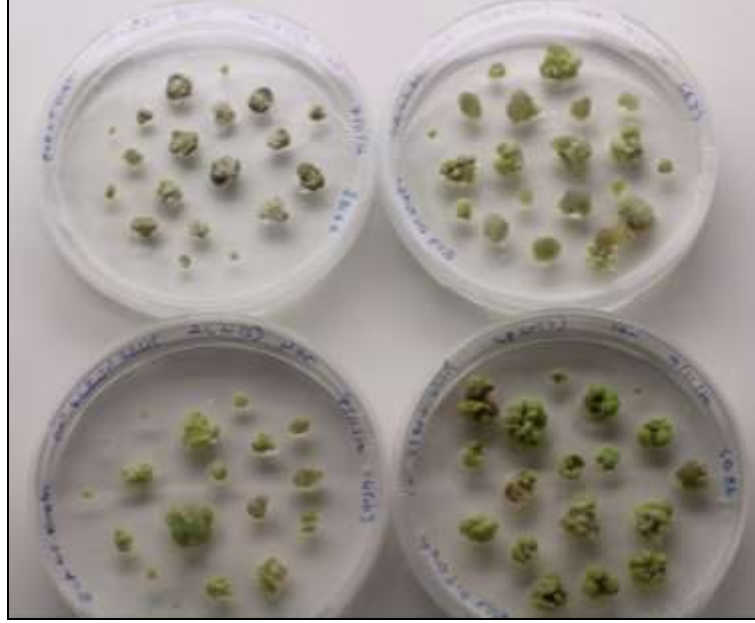
Şekil 4.32. G6 genotipine ait 4 farklı besin ortamındaki anterlerin 1 aylık gelişimleri.

G6 genotipine ait A3 içerikli besin ortamındaki kallusların çok büyük olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.33.).



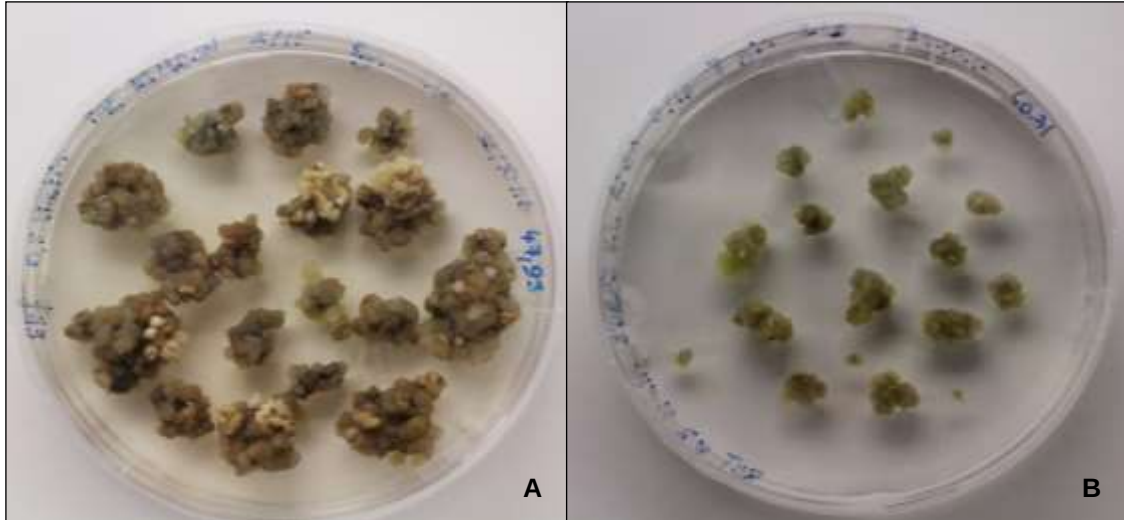
Şekil 4.33. G6 genotipine ait A3 ortamındaki kallus örnekleri.

G2 genotipine ait A3 ve A1 içelikli besin ortamındaki kallusların sert opak bir yapıya sahip olduğu gözlemlenmiştir (**Şekil 4.34.**).



Şekil 4.34. G2 genotipine ait kallus örnekleri.

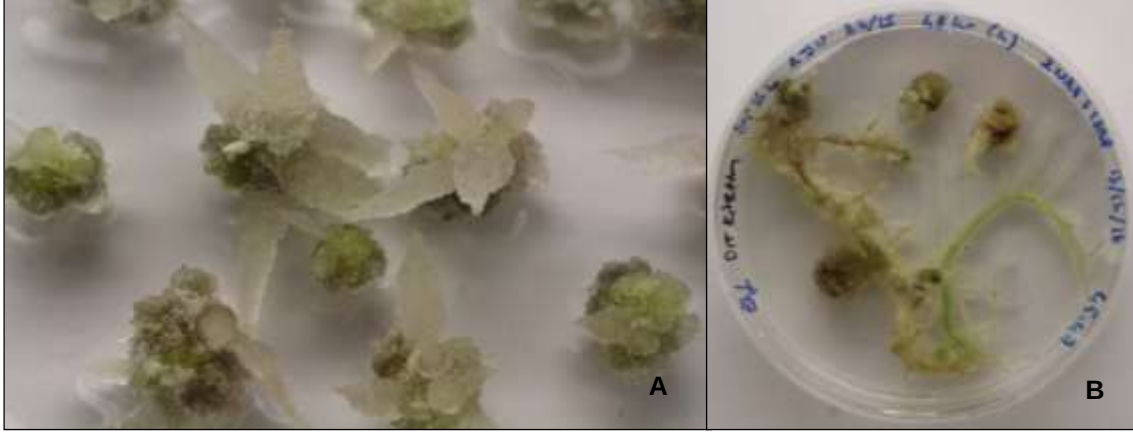
1 ay sonunda farklı kombinasyonlarda embriyojenik kalluslar ve rejenerasyonlar gözlemlenmiştir. Rejenerasyonların yapısı gövde ve kök olarak genotip ve besin ortamlarına bağılı değişmektedir. Aynı başlangıç besin ortamından gelen çalışmalarda hem kök hem de gövde rejenerasyonu gözlenmektedir (**Şekil 4.35-51**).



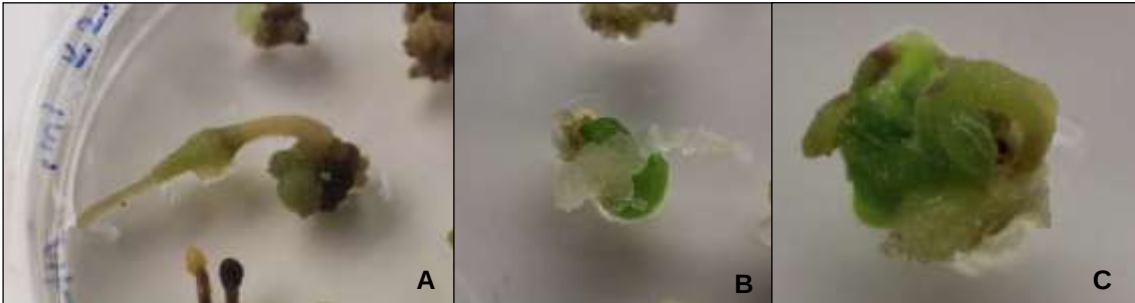
Şekil 4.35. G3 genotipine ait embriyojenik kallus (A). G5 genotipine ait embriyojenik kallus (B).



Şekil 4.36. G1 genotipinden gelişen; 24 saat soğuk uygulama A4 besin ortamı içeriğine ait rejenerasyon (A), 48 saat soğuk uygulama A4 besin ortamı içeriğine ait rejenerasyon (B), 72 saat soğuk uygulama A4 besin ortamı içeriğine ait



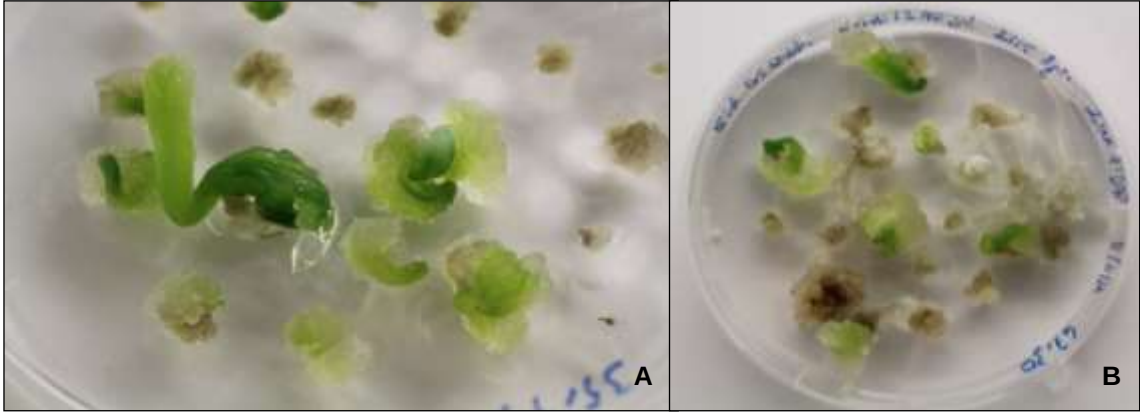
Şekil 4.37. G2 genotipinden gelişen; 48 saat soğuk uygulama A4 besin ortamı içeriğine ait rejenerasyon (A), 48 saat soğuk uygulama A4 besin ortamı içeriğine ait rejenerasyon (B).



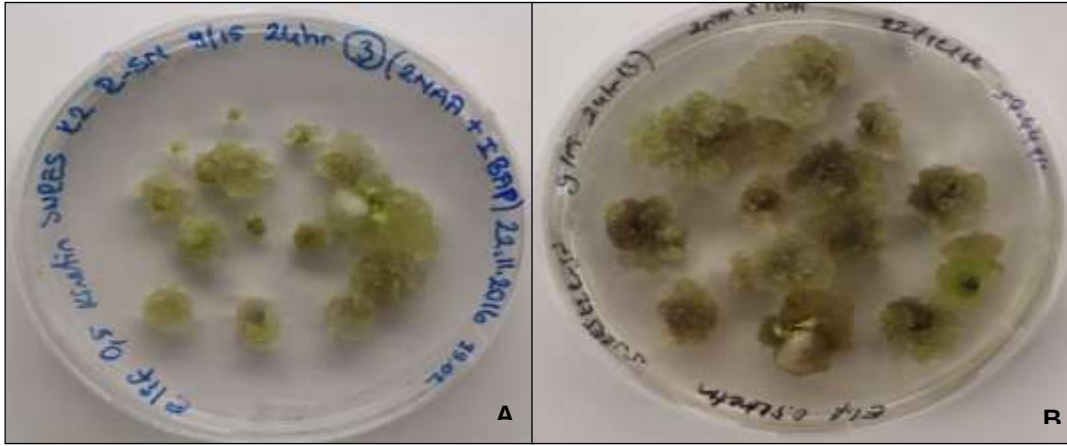
Şekil 4.38. G3 genotipinden gelişen; 4 gün sıcak uygulama A4 besin ortamı içeriğine ait rejenerasyon (A), G4 genotipinden gelişen, 2 gün sıcak uygulama A1 besin ortamı içeriğine sahip rejenerasyon (B), 2 gün sıcak uygulama A1 besin ortamı içeriğine sahip rejenerasyon (C).



Şekil 4.39. G5 genotipinden gelişen; 8 gün sıcak uygulama A4 besin ortamı içeriğine ait rejenerasyon (A), 8 gün sıcak uygulama A1 besin ortamı içeriğine ait rejenerasyon (B), 24 saat soğuk uygulama A4 besin ortamı içeriğine ait rejenerasyon (C).



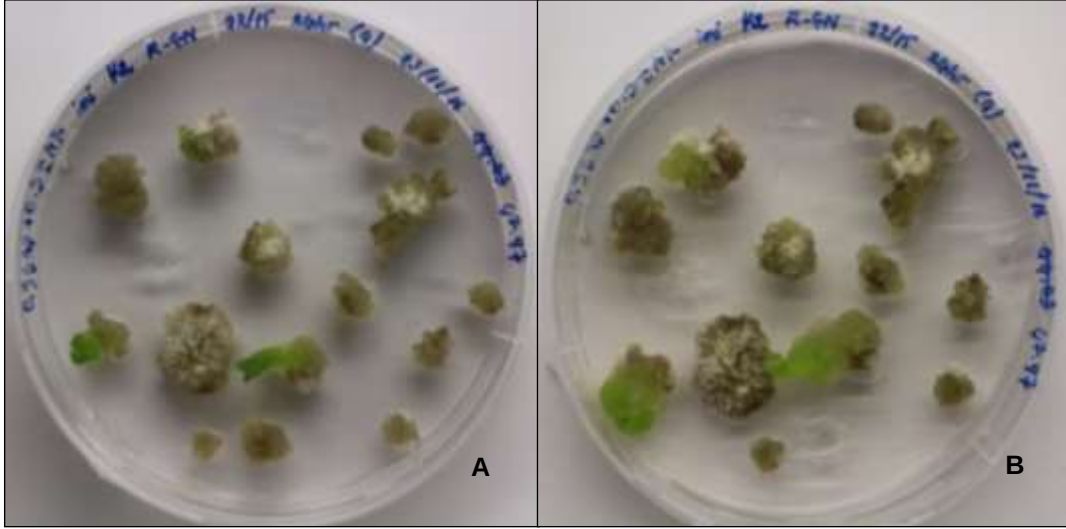
Şekil 4.40. G6 genotipinden gelişen; 4 gün sıcak uygulama A4 besin ortamı içeriğine ait rejenerasyon (A), 4 gün sıcak uygulama A4 besin ortamı içeriğine ait rejenerasyon (B).



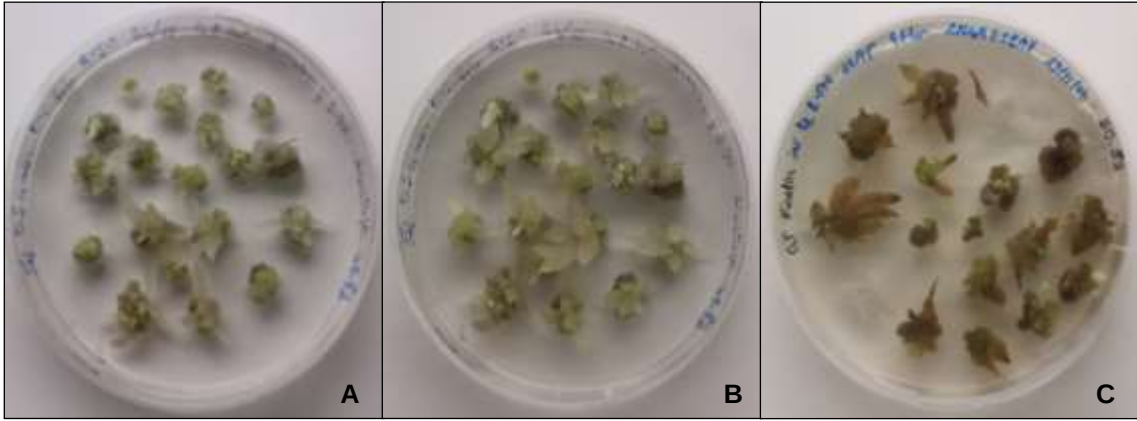
Şekil 4.41. G5 genotipinden gelişen; 24 saat soğuk uygulama A4 besin ortamı içeriğine ait rejenerasyon (A), 1 ay sonraki gelişimi (B).



Şekil 4.42. G5 genotipinden gelişen; 4 gün sıcak uygulama A4 besin ortamı içeriğine ait rejenerasyon (A), 1 hafta sonraki gelişimi (B), 1 ay sonraki gelişimi (C).



Şekil 4.43. G2 genotipinden gelişen; 24 saat soğuk uygulama A3 besin ortamı içeriğine ait rejenerasyon (A), 10 gün sonraki gelişimi (B).



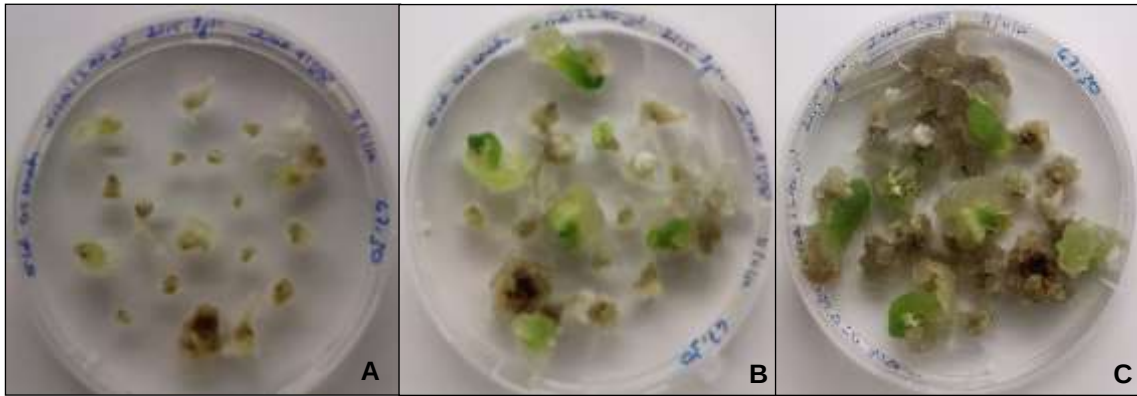
Şekil 4.44. G2 genotipinden gelişen; 48 saat soğuk uygulama A4 besin ortamı içeriğine ait rejenerasyon (A), 1 hafta sonraki gelişimi (B). 6 hafta sonraki gelişimi (C).



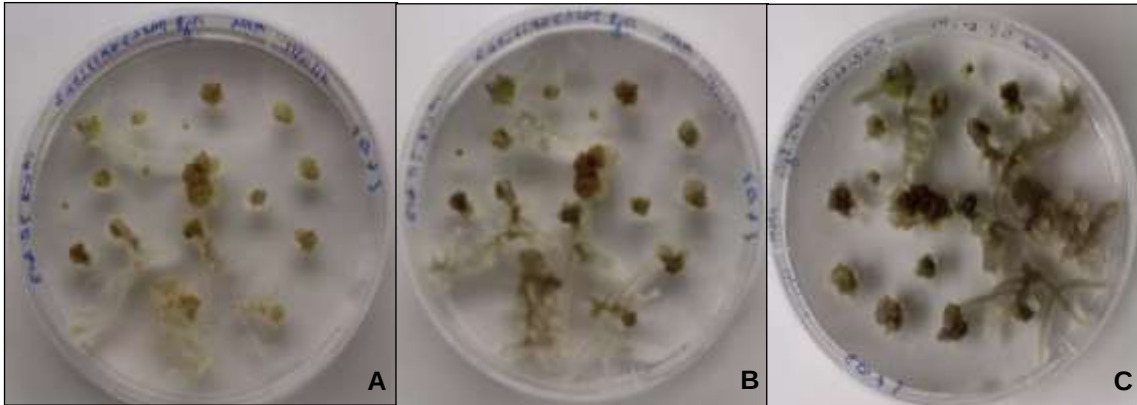
Şekil 4.45. G6 genotipinden gelişen; 4 gün sıcak uygulama A4 besin ortamı içeriğine ait rejenerasyon (A), 1 hafta sonraki gelişimi (B). 1 ay sonraki gelişimi (C).



Şekil 4.46. G6 genotipinden gelişen; ;4 gün sıcak uygulama A1 besin ortamı içeriğine ait rejenerasyon (A), 1 hafta sonraki gelişimi (B). 1 ay sonraki gelişimi (C).



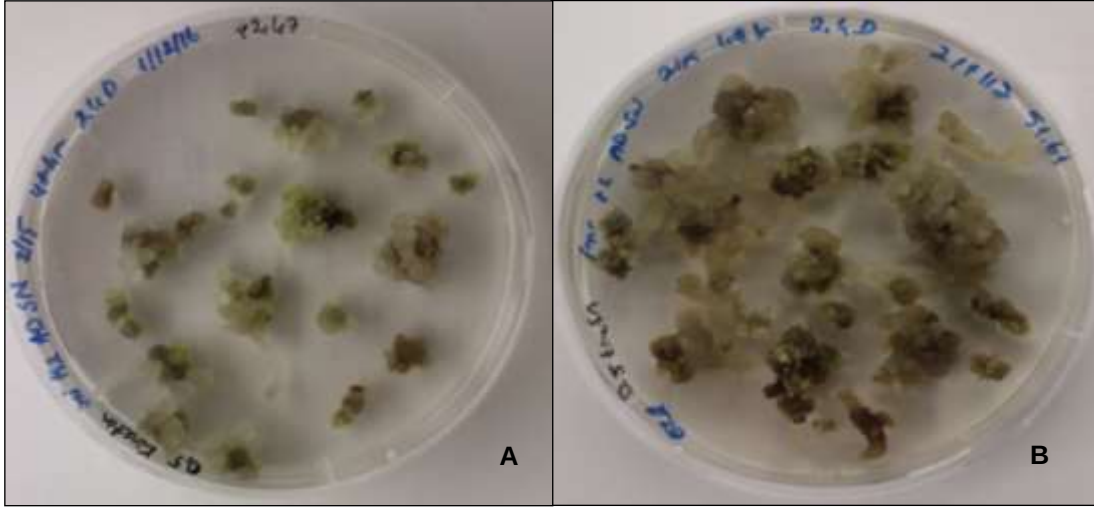
Şekil 4.47. G6 genotipinden gelişen; 8 gün sıcak uygulama A4 besin ortamı içeriğine ait rejenerasyon (A), 1 hafta sonraki gelişimi (B). 17 gün sonraki gelişimi (C).



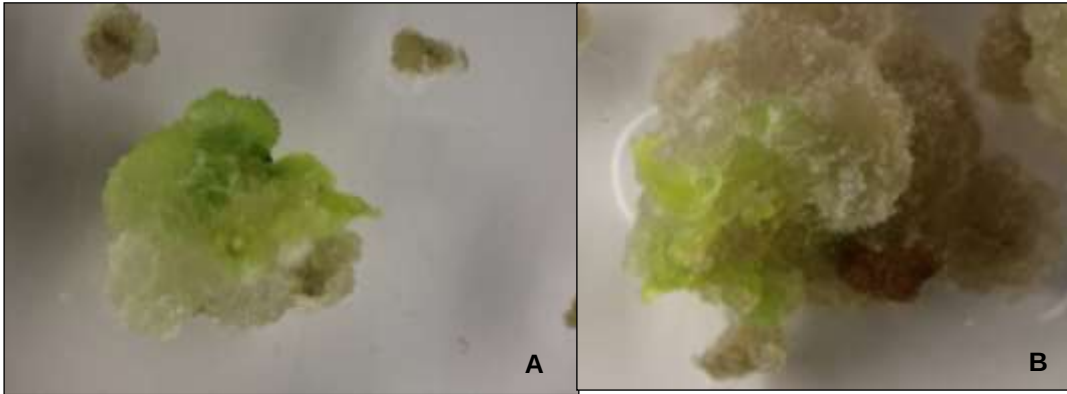
Şekil 4.48. G6 genotipinden gelişen; 8 gün sıcak uygulama A1 besin ortamı içeriğine ait rejenerasyon (A), 1 hafta sonraki gelişimi (B). 17 gün sonraki gelişimi (C).



Şekil 4.49. G1 genotipinden gelişen; 2 gün sıcak uygulama A4 besin ortamı içeriğine ait rejenerasyon (A), 10 gün sonraki gelişimi (B). 3 hafta sonraki gelişimi (C).



Şekil 4.50. G3 genotipinden gelişen; 48 saat soğuk uygulama A2 besin ortamı içeriğine ait rejenerasyon (A), 24 gün sonraki gelişimi (B).



Şekil 4.51. G6 genotipinden gelişen; 8 gün sıcak uygulama A2 besin ortamı içeriğine ait rejenerasyon (A), 16 gün sonraki gelişimi (B).

Altı farklı genotip (İMİ K2 R SN 7/15, İMİ K2 R SN 22/15, İMİ K2 R SN 25/15, İMİ K2 AD SN 2/15, SURES K2 R SN 9/15 ve SURES K2 AD SN 2/15), 7 farklı ön uygulaması (2 gün 35 °C, 4 gün 35 °C, 8 gün 35 °C, 12 gün 35 °C, 24 saat 4 °C, 48 saat 4 °C ve 72 saat 4 °C) ve 4 farklı besin ortamı uygulaması (0.5 mg/L BAP+ 0.5 mg/L NAA, 0.5 mg/L BAP+ 0.5 mg/L IAA,

0.5 mg/L BAP+ 0.5 mg/L 2,4D, 1 mg/L BAP+ 2 mg/L NAA) ile yapılan anter kültürü çalışmaları sonucunda elde edilen androgenez uyartımları incelenerek besin ortamlarına ekilen anter sayısı, oluşan kallus sayısı, embriyogenik olan ve embriyogenik olmayan kallus değerleri kaydedildi (**Tablo 4.3,4**).

Tablo 4.3. Farklı genotiplerde farklı zaman aralıklarındaki soğuk ön uygulamaları takiben farklı besin ortamlarındaki üç tekrar sonucundaki ortalama anter, kallus, embriyogenik kallus, % kallus, % embriyogenik kallus ve rejenerasyon değerleri.

Ön uygulama	Genotip	Besin ortamı kodu	Anter	Kallus	% Kallus	Emriyogenik kallus	% Emriyogenik kallus	Rejenerasyon	% Rejenerasyon	Rejenerasyon yapısı
24 saat soğuk uygulama	G1	A1	80	74	93	23	31	1	4	kök
		A2	80	76	95	22	29	5	23	kök
		A3	80	71	89	20	28	3	15	kök
		A4	80	78	98	20	26	0	0	
	G2	A1	60	45	75	17	38	0	0	
		A2	60	53	88	25	47	0	0	
		A3	80	65	81	29	45	3	10	kök
		A4	60	49	82	32	65	0	0	
	G4	A1	20	20	100	13	65	0	0	
		A2	20	14	70	8	57	0	0	
		A3	20	17	85	6	35	0	0	
		A4	20	16	80	8	50	0	0	
	G5	A1	60	45	75	31	69	1	3	kök
		A2	60	29	48	22	76	0	0	
		A3	60	34	57	23	68	0	0	
		A4	60	39	65	30	77	2	7	kök
	G6	A1	40	25	63	22	88	0	0	
		A2	40	31	78	20	65	1	5	gövde
		A3	40	37	93	15	41	0	0	
		A4	20	20	100	11	55	0	0	
48 saat soğuk uygulama	G1	A1	60	56	93	25	45	3	12	kök
		A2	60	59	98	24	41	7	29	kök
		A3	60	60	100	18	30	0	0	
		A4	60	59	98	29	49	6	21	kök
	G2	A1	79	73	92	44	60	4	9	kök
		A2	81	79	98	57	72	1	2	kök
		A3	80	78	98	28	36	0	0	
		A4	79	67	85	39	58	20	51	kök
	G3	A1	20	18	90	5	28	0	0	

72 saat soğuk uygulama		A2	20	20	100	9	45	7	78	kök
		A3	20	20	100	9	45	0	0	
		A4	20	20	100	6	30	2	33	kök
	G4	A1	40	35	88	1	3	1	100	gövde
		A2	40	37	93	14	38	0	0	
		A3	40	33	83	3	9	0	0	
		A4	39	39	100	6	15	0	0	
	G5	A1	60	47	78	24	51	1	4	kök
		A2	40	40	100	22	55	1	5	kök
		A3	40	38	95	14	37	0	0	
		A4	60	46	77	26	57	0	0	
	G6	A1	40	36	90	12	33	0	0	
		A2	40	37	93	19	51	6	32	kök
		A3	40	40	100	8	20	0	0	
		A4	40	36	90	17	47	0	0	
	G1	A1	60	56	93	21	38	0	0	
		A2	60	55	92	31	56	0	0	
		A3	60	56	93	30	54	2	7	gövde
		A4	60	54	90	31	57	3	10	kök
	G2	A1	61	59	97	40	68	1	3	kök
		A2	60	60	100	51	85	3	6	kök
		A3	60	59	98	20	34	0	0	
		A4	60	58	97	33	57	4	12	kök
	G3	A1	20	18	90	10	56	5	50	kök
		A2	20	20	100	16	80	0	0	
		A3	20	20	100	8	40	3	38	kök
		A4	20	20	100	5	25	1	20	kök
	G6	A1	40	40	100	25	63	5	20	kök
		A2	40	38	95	36	95	1	3	kök
		A3	40	39	98	27	69	0	0	
		A4	40	39	98	24	62	2	8	kök

Soğuk ön uygulamaya ait örneklerden elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde 24 saatlik ön uygulamada G3 genotipine ait anterlerin kullanıldığı tüm besin ortamlarında ve 72 saatlik ön uygulamada G4 ve G5 genotiplerine ait anterlerin kullanıldığı tüm besin ortamlarında kontaminasyon görüldüğü için ilgili değerler kaydedilemedi.

Tablo 4.4. Farklı genotiplerde farklı zaman aralıklarındaki sıcak ön uygulamaları takiben farklı besin ortamlarındaki üç tekrar sonucundaki ortalama anter, kallus, embriyojenik kallus, % kallus, % embriyojenik kallus ve rejenerasyon değerleri.

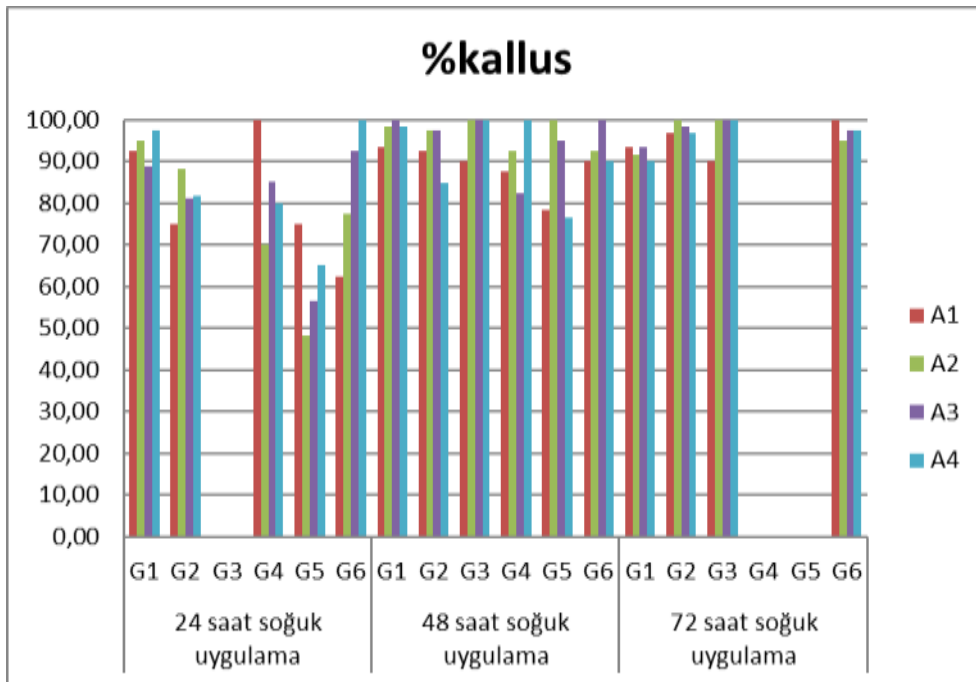
SICAK UYGULAMA(+35 °C)										
uygulama	genotip	hormon	Anter	Kallus	% Kallus	Emriyojenik kallus	% Emriyojenik kallus	Rejenerasyon	% Rejenerasyon	Rejenerasyon yapısı
2 gün sıcak uygulama	G1	A1	40	27	68	17	63	1	6	kök
		A2	40	31	78	14	45	0	0	
		A3	40	32	80	21	66	2	10	kök
		A4	40	35	88	21	60	2	10	kök,gövde
	G2	A1	20	20	100	11	55	0	0	
		A2	40	19	48	8	42	0	0	
		A3	20	20	100	12	60	0	0	
		A4	20	20	100	11	55	0	0	
	G3	A1	20	3	15	0	0	0	0	
		A3	20	3	15	2	67	0	0	
		A4	20	5	25	2	40	0	0	
	G4	A1	20	9	45	7	78	1	14	gövde
		A2	30	12	40	8	67	0	0	
		A3	20	8	40	6	75	0	0	
		A4	30	7	23	6	86	0	0	
	G5	A1	20	1	5	1	100	1		kök
		A4	20	3	15	2	67	0	0	
	G6	A1	35	32	91	17	53	0	0	
		A2	20	13	65	7	54	0	0	
		A3	20	20	100	14	70	0	0	
		A4	30	14	47	9	64	0	0	
4 gün sıcak uygulama	G1	A1	20	5	25	4	80	0	0	
		A2	20	6	30	1	17	0		
		A4	20	4	20	1	25	1	100	kök
	G2	A1	10	4	40	1	25	0	0	
		A2	20	5	25	2	40	0	0	
		A3	20	2	10	1	50	0	0	
		A4	20	1	5	1	100	0	0	
	G3	A1	20	15	75	8	53	1	13	kök
		A2	20	10	50	7	70	3	43	kök
		A3	20	8	40	10	125	1	10	kök
		A4	20	12	60	12	100	2	17	kök,gövde
	G4	A2	20	17	85	9	53	0	0	
		A4	20	17	85	5	29	0	0	

8 gün sıcak uygulama	G5	A1	40	29	73	25	86	3	12	kök
		A2	60	52	87	42	81	0	0	
		A3	40	27	68	11	41	0	0	
		A4	40	29	73	20	69	8	40	kök
	G6	A1	20	15	75	16	107	4	25	kök,gövde
		A2	20	19	95	19	100	1	5	kök,gövde
		A3	20	20	100	14	70	1	7	gövde
		A4	20	20	100	12	60	8	67	kök,gövde
	G1	A1	40	11	28	7	64	1	14	kök
		A2	20	15	75	6	40	0	0	
		A3	20	8	40	3	38	0	0	
		A4	40	20	50	13	65	6	46	kök
	G2	A1	20	2	10	2	100	0	0	
		A2	20	10	50	9	90	0	0	
		A4	20	3	15	1	33	0	0	
	G3	A1	20	14	70	14	100	6	43	kök
		A2	20	17	85	17	100	0	0	
		A3	20	10	50	10	100	3	30	kök
		A4	20	12	60	10	83	0	0	
		A2	20	12	60	12	100	0	0	
		A3	20	9	45	6	67	0	0	
		A4	20	8	40	3	38	0	0	
	G5	A1	60	31	52	19	61	6	32	kök
		A2	20	16	80	14	88	0	0	
		A3	40	24	60	15	63	2	13	kök
		A4	40	22	55	18	82	5	28	kök
12 gün sıcak uygulama	G6	A1	40	19	48	11	58	5	45	kök
		A2	40	25	63	21	84	2	10	kök
		A3	20	12	60	5	42	0	0	
		A4	20	19	95	12	63	12	100	kök,gövde
	G2	A1	40	4	10	0	0	0		
		A2	40	2	5	2	100	0	0	
		A3	40	8	20	8	100	1	13	kök
		A4	40	6	15	1	17	0		
	G3	A1	20	10	50	3	30	0	0	
		A2	20	9	45	0	0	0		
		A3	20	8	40	1	13	1	100	kök
		A4	20	4	20	2	50	2	100	kök
	G4	A1	20	2	10	1	50	0	0	
		A4	20	6	30	6	100	0	0	

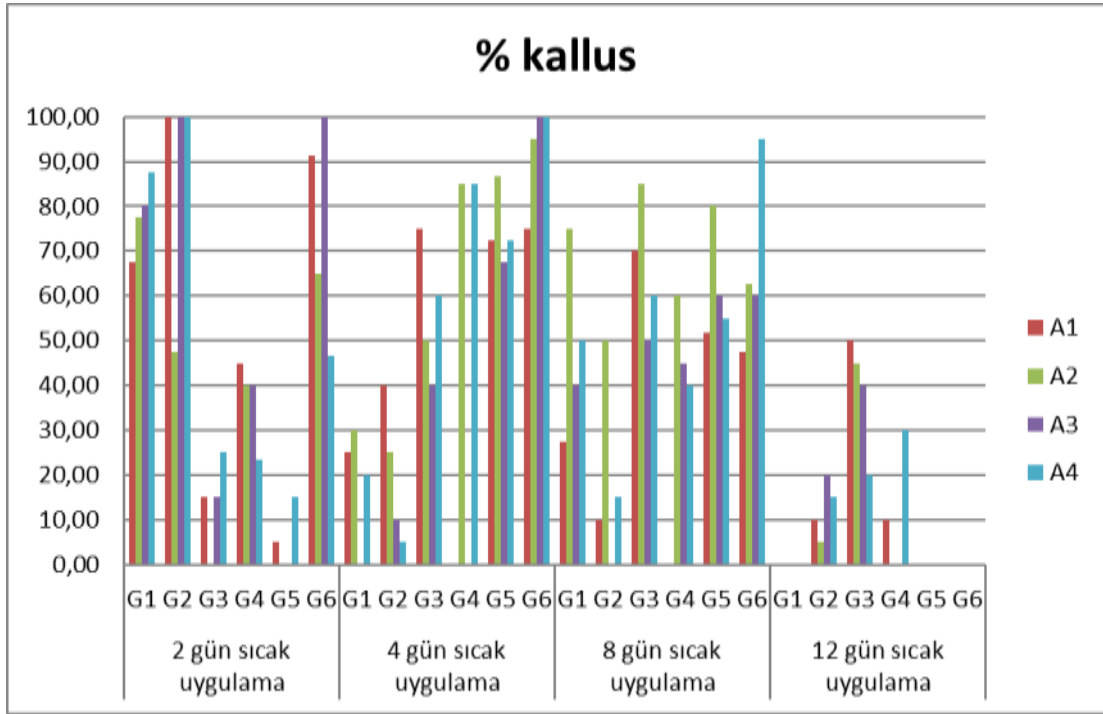
Sıcak ön uygulamaya ait örneklerden elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde;

- 2 günlük ön uygulamada G3 genotipine ait anterlerin kullanıldığı A2, G5 genotipine ait anterlerin kullanıldığı A2 ve A3 besin ortamlarında,
- 4 günlük ön uygulamada G1 genotipine ait anterlerin kullanıldığı A3, G4 genotipine ait anterlerin kullanıldığı A1 ve A3 besin ortamlarında,
- 8 günlük ön uygulamada G2 genotipine ait anterlerin kullanıldığı A3 ve G4 genotipine ait anterlerin kullanıldığı A1 besin ortamlarında,
- 12 günlük ön uygulamada G1, G5 ve G6 genotiplerine ait anterlerin kullanıldığı tüm besin ortamlarında, G4 genotipine ait anterlerin kullanıldığı A2 ve A4 besin ortamlarında kontaminasyon görüldüğü için ilgili değerler kaydedilemedi.

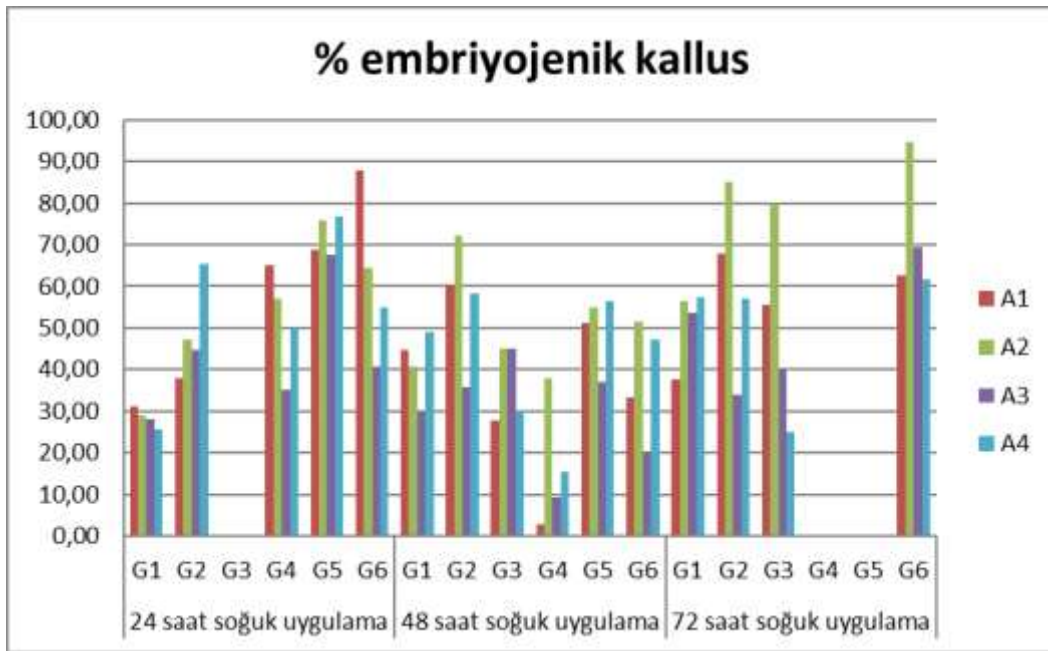
Soğuk ve sıcak ön uygulamaların, genotiplerin ve başlangıç besin ortamlarının % kallus, % embriyogenik kallus ve % rejenerasyon değerleri üzerine etkileri **Şekil 4.52-57**'de verilmiştir.



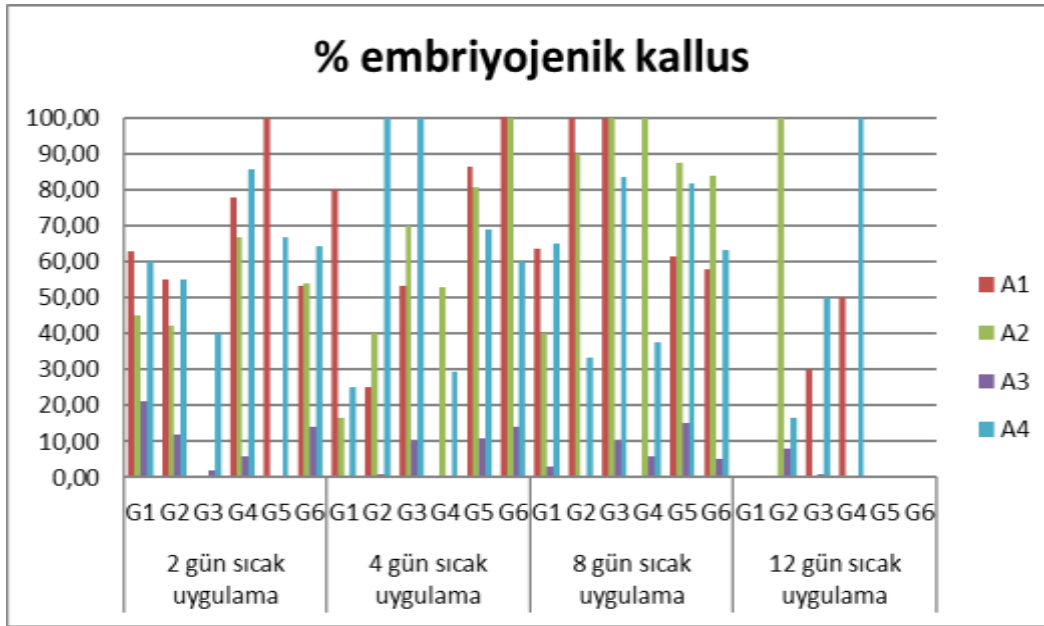
Şekil 4.52. Soğuk uygulama ile genotip ve farklı besin ortamlarının % kallus eldesi üzerine etkisi.



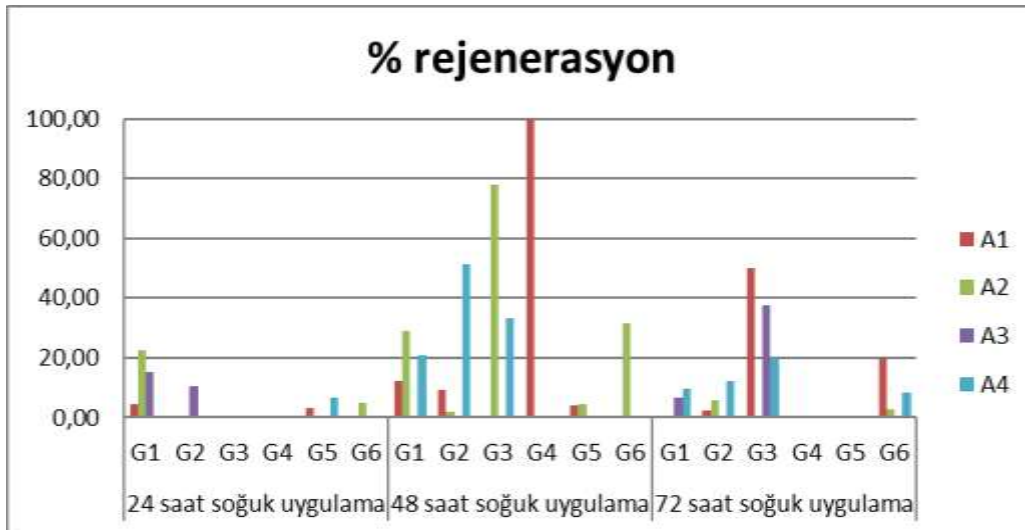
Şekil 4.53. Sıcak uygulama ile genotip ve farklı besin ortamlarının % kallus eldesi üzerine etkisi.



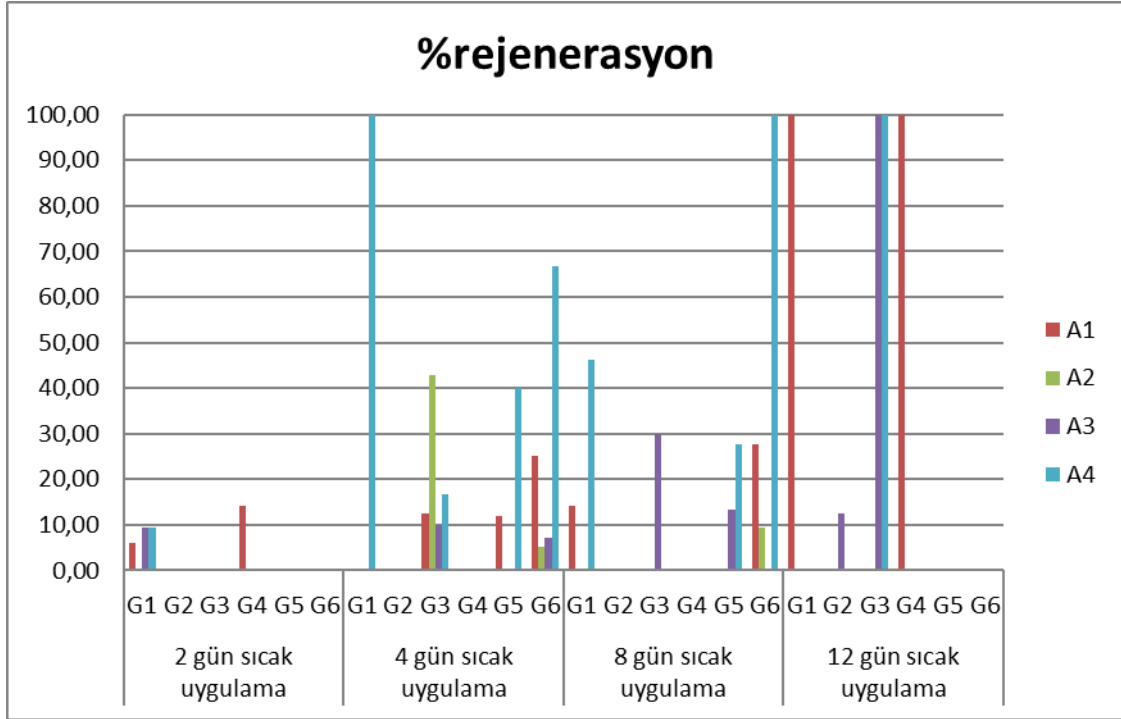
Şekil 4.54. Soğuk ön uygulama, genotip ve farklı besin ortamlarının % embriyojenik kallus eldesi üzerine etkisi.



Şekil 4.55. Sıcak ön uygulama, genotip ve farklı besin ortamlarının % embriyojenik kallus eldesi üzerine etkisi.

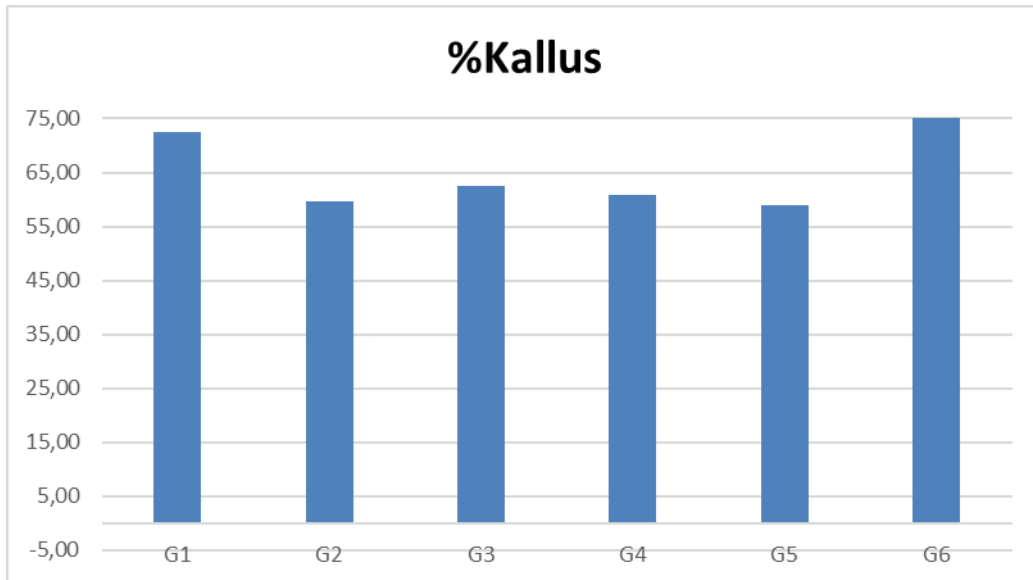


Şekil 4.56. Soğuk ön uygulama, genotip ve farklı besin ortamlarının % rejenerasyon üzerine etkisi.

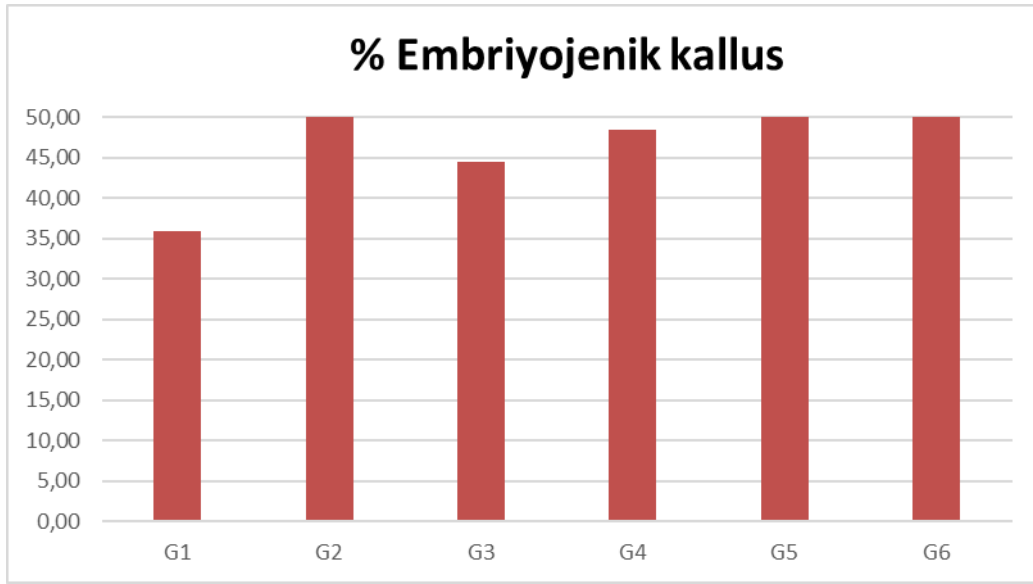


Şekil 4.57. Sıcak ön uygulama, genotip ve farklı besin ortamlarının % rejenerasyon üzerine etkisi.

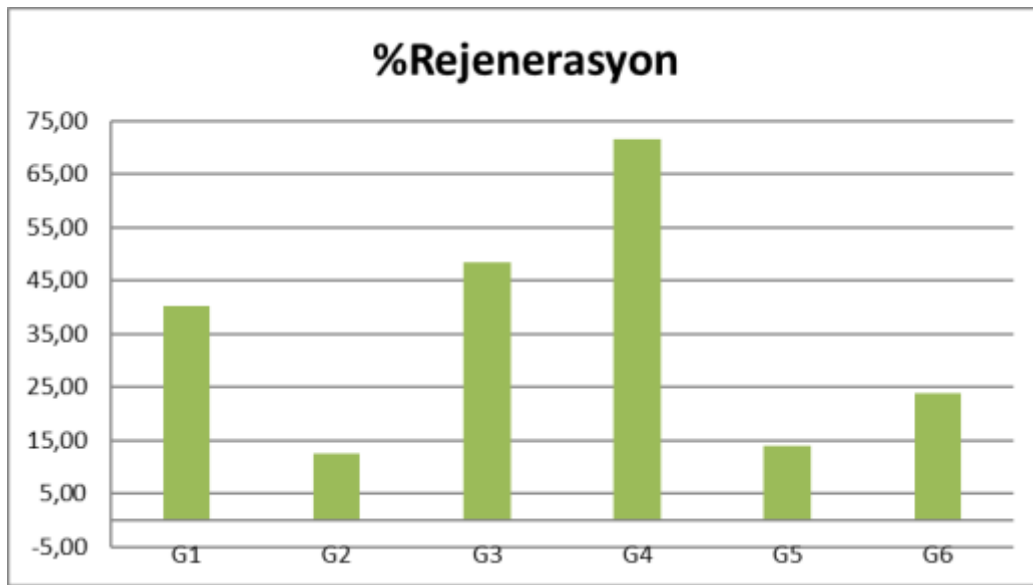
Tüm uygulamalarda genotiplere göre elde edilen % kallus, % embriyogenik kallus ve %rejenerasyon değerleri **Şekil 4.58-60**'de verildi.



Şekil 4.58. Besin ortamı dikkate alınmaksızın genotipin % kallus üzerine etkisi.

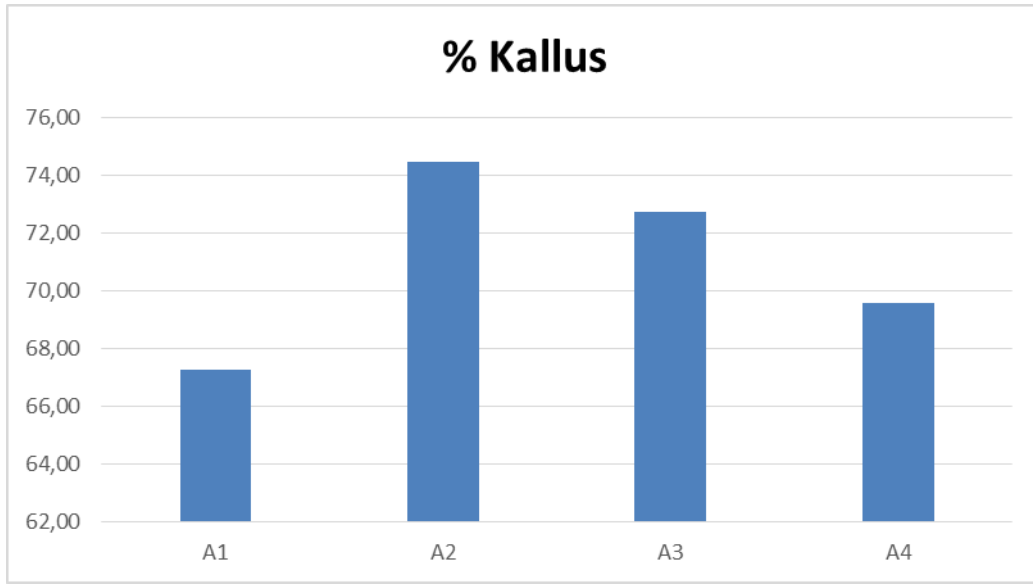


Şekil 4.59. Besin ortamı dikkate alınmaksızın genotipin % embriyojenik kallus üzerine etkisi.

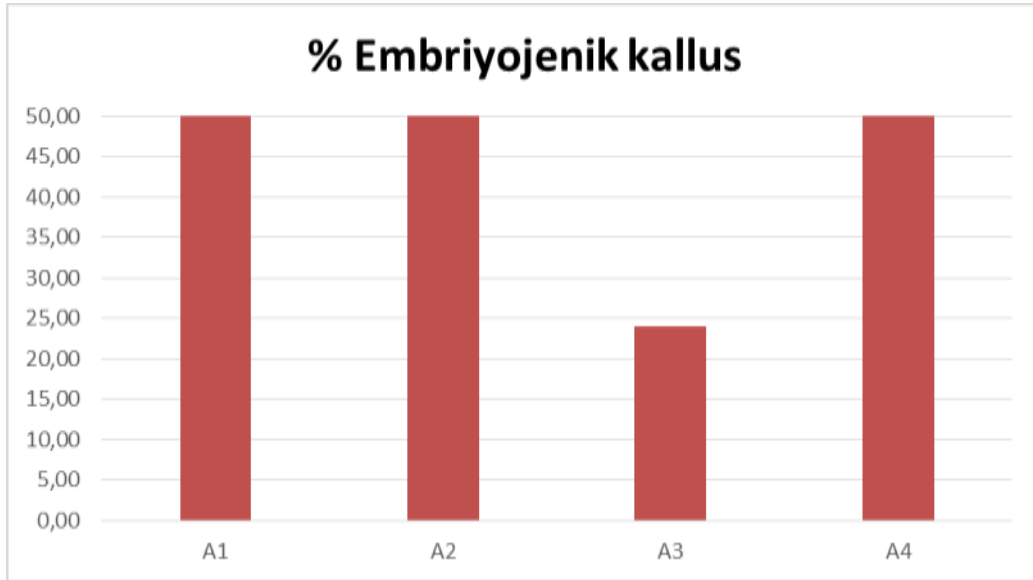


Şekil 4.60. Besin ortamı dikkate alınmaksızın genotipin % rejenerasyon üzerine etkisi.

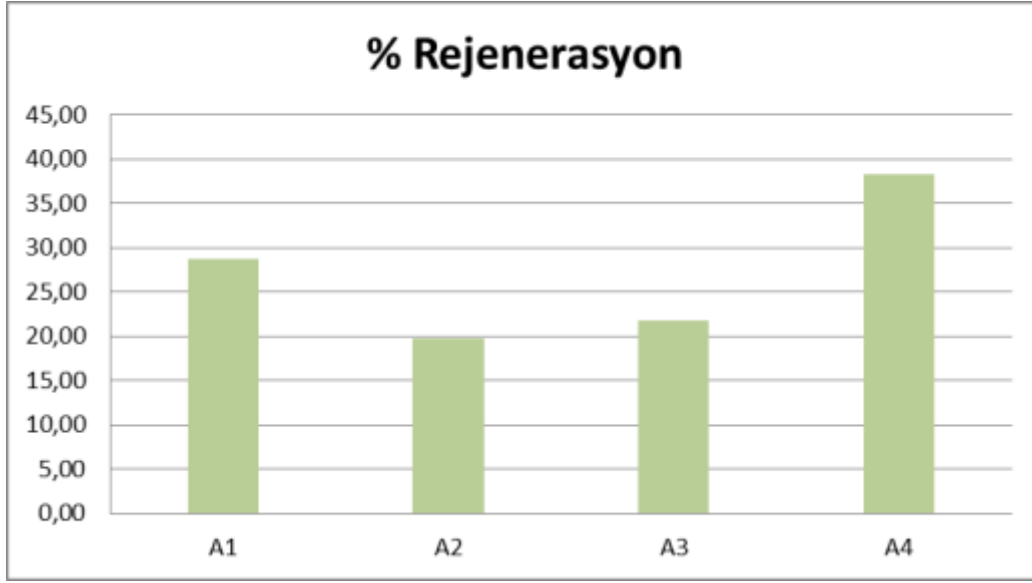
Tüm uygulamalarda genotipler dikkate alınmaksızın besin ortamlarına göre elde edilen % kallus, % embriyojenik kallus ve %rejenerasyon değerleri **Şekil 4.61-63'**de verildi.



Şekil 4.61. Genotip dikkate alınmaksızın besin ortamının % kallus üzerine etkisi.



Şekil 4.62. Genotip dikkate alınmaksızın besin ortamının % embriyojenik kallus üzerine etkisi.



Şekil 4.63. Genotip dikkate alınmaksızın besin ortamının % rejenerasyon üzerine etkisi.

Ayçiçeğinde farklı ön uygulamalar, besin ortamları ve genotiplerin anter kültüründeki etkileri değerlendirildiğinde aşağıda sıralanan bulguların ön plana çıktığı görülmüştür.

- Yapılan ön uygulamaların kallus, embriyojenik kallus ve rejenerasyon verileri incelendiğinde tarla materyalinden androgenik bitki üretiminde soğuk ön uygulamanın sıcak ön uygulamaya göre daha etkin olduğu saptanmıştır.
- Soğuk (+4°C) ön uygulamanın kallus oluşturma yüzdesinin en düşük (%80.6) 24 saatte, en yüksek (%96.2) 72 saatte; +35°C sıcak ön uygulamanın kallus oluşturma yüzdesinin en düşük (%23.75) 12 günde, en yüksek (%58.9) 4 günde olduğu belirlenmiştir. +4°C soğuk ön uygulamada elde edilen embriyojenik kallus oluşturma yüzdesi en düşük (%39.8) 48 saatte, en yüksek (%58.6) 72 saatte iken; +35 °C sıcak ön uygulamanın embriyojenik kallus oluşturma yüzdesi ise en düşük (%47.8) 12 günde, en yüksek (%58.7) 8 gündedir. En iyi rejenerasyon oranı (%78.1) 12 gün sıcak uygulamada en düşük rejenerasyon oranıysa (%8.6) 24 saat soğuk uygulamada saptanmıştır. Tüm parametreler göz önüne alındığında çalışılan uygulamalar içerisinde 72 saat +4°C soğuk ön uygulamanın en etkin olduğu görülmüştür.
- Besin ortamları arasında kallus oluşturma yüzdesi en yüksek olan (%74.4) A2, en düşük olan ise (%67.2) A1 içerikli besin ortamıdır. Embriyojenik kallus oluşturma yüzdesi en yüksek olan besin ortamı (%64.1) A2, en düşük olan besin ortamı ise (%24) A3 içerikli besin ortamıdır. En iyi rejenerasyon oranı (%38.29) A4, en düşük rejenerasyon oranıysa (%19.62) A2 içerikli besin ortamında elde edilmiştir. Bu verilere dayanarak A2 bitki büyüme düzenleyicisi içeren besin ortamlarının ayçiçeğinde androgenik bitki üretiminde etkili olduğu belirlenmiştir.

- Çalışmada kullanılan genotipler değerlendirildiğinde ise, kallus oluşturma yüzdesi en yüksek G6 (%84,7), en düşük G5 (%59.04) genotipine ait iken embriyojenik kallus parametresi için en yüksek oran G6 (%65.7), en düşük G1 (%35.9) genotipine aittir. En iyi rejenerasyon oranı (%71.43) G4 genotipinde, en düşük rejenerasyon oranıysa (12,6) G2 genotipindedir.
- Ayrıca bu sonuçlara ek olarak yapılan çalışmalar doğrultusunda tarladan alınan örneklerin taze çalışılması gerektiğine varılmıştır. Soğuk uygulama tazeliğini korumak açısından etkili bir yöntem olduğu için sıcak uygulamaya göre daha verimli sonuçlar vermektedir. Örnekler tarladan alındıktan sonra bekledikçe canlılığını yitirmiştir ve bu örneklerle çalışmak verimi oldukça düşürmekle beraber kontaminasyona neden olmuştur. Sıcak uygulamada petrilerin içinin buharlaşması da kontaminasyona neden olan etmenlerden bir tanesidir.

4.3. Mikrospor Kültürü ile Haploid Bitkilerin Elde Edilmesi

- Mikrospor izolasyonu için optimizasyonu gerçekleştirilen protokoller ve ana adımları ile bu protokollere ait sonuçlar **Tablo 4.5.**'de verilmiştir.

Tablo 4. 5. Optimizasyonu gerçekleştirilen protokoller ve sonuçları.

Optimizasyonu gerçekleştirilen protokollerin ana adımları ile sonuçları.				
Deneyisel Adımlar	Protokol 1 (Gürel ve ark., 1991)	Protokol 2 (Mohammadi, 2011)	Protokol 3 (Todorova ve ark., 2014)	Protokol 4 (Özsan, 2014)
Bitki materyalinin temini	Tarla + Bitki yetiştirme odası koşulları	Tarla + Bitki yetiştirme odası koşulları	Tarla koşulları	Tarla koşulları
Sonuçlar	 Örnekler kontaminasyondan dolayı kaybedilmiştir.	 Örnekler kontaminasyondan dolayı kaybedilmiştir.	 Örnekler kontaminasyondan dolayı kaybedilmiştir.	 Ornekler kontaminasyondan dolayı kaybedilmiştir.

4.4. Polen Işınlama ile Haploid Bitkilerin Elde Edilmesi

4.4.1. Bitkisel Materyalin Hazırlanması

Çalışmada kullanılacak ayçiçeği hatlarının ekiminden embriyo kurtarma aşamasına uygun materyalin eldesine kadar olan süreç, Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarlalarında gerçekleştirildi. Ekimden iki ay sonra çiçek açma dönemine giren ayçiçekleri tomurcuklar açmadan önce dışarıdan toz alımını önlemek için torbalandı.

Çiçekcikler açmaya başladığında CMS olmayan hatlar günlük olarak emasküle edildi. Bu işlem sonucu toplanan polenler ışınlama işlemine kadar +4°C'de bekletildi. Polenler bu şekilde 10 güne kadar saklanabilmekte (ışınlama öncesi ve sonrası dahil), 10 günden sonra kullanımı tavsiye edilmemektedir. Işınlama için tek bir hattan elde edilen polenler değil, birçok hattan elde edilen polenlerin karışımı kullanıldı. Polenler taşınırken de buz aküleri ile soğukta muhafaza edildi. Işınlama için verilen doz için gerekli süre radyasyon kaynağının birim zamanda yaptığı ışıma miktarı üzerinden hesaplandı. Zamanla radyasyon kaynağında bir miktar bozunma olduğu için ışıma oranı değişmekte ancak uygulamalar arası süre o değişimde anlam ifade edecek kadar uzun olmadığından her uygulamada aynı süreler kullanıldı. Gamma-Pak şirketi kendi hesaplamalarında birim ışımayı 2000 g/saat olarak kabul etmektedir. Buradan ışınlama için gerekli süreler; 500 Gy için 15 dakika, 750 Gy için 22,5 dakika ve 1000 Gy ışınlama için 30 dakika olarak belirlendi. Dört defa ışınlama uygulaması yapıldı. Tozlamaların çoğunluğu ışınlamanın yapıldığı gün gerçekleştirildi ancak elde kalan polenlerle sonraki 8. güne kadar diğer çiçeklerle de tozlama yapıldı ve ışınlanan polenin muhafaza ömrü değerlendirildi. Işınlama sonrası polenler yine +4°C'de muhafaza edildi. Işınlama ve tozlama uygulamalarının özeti **Tablo 4.6**'da görülebilir.

Tablo 4.6. Polen ışınlama ve tozlama tarihleri ile tozlama yapılan hatlar.

Işınlama Tarihi	Tozlama Tarihi	Tozlanan Hatlar
30.06.2017	30.06.2017	H1 - H16 arası
06.07.2017	06.07.2017	H17 - H35 arası (H31 hariç)
	07.07.2017	H31 ve H36 - H40 arası
	11.07.2017	H41 - H44 arası
	14.07.2017	H45 - H47 arası
17.07.2017	17.07.2017	H48 - H61 arası
	21.07.2017	H62 - H75 arası
28.07.2017	28.07.2017	H76 - H78 arası
	03.08.2017	H79 - H80 arası

Çiçek kafaları tozlama sonrası ışınlama dozu, tarih ve ıslah hattı ismini belirtecek şekilde etiketlendi ve yabancı tozlaşmayı önlemek için tekrar torbalandı, daha sonra 12-15 gün embriyo oluşumu için beklendi (**Tablo 4.7.**). İlk ışınlama uygulamasından sonra embriyoların 12-15 gün aralığında çok az gelişmiş olduğu belirlendiği için çiçek başı alma aralığı 20. güne kadar uzatıldı, son ışınlama uygulamasından sonra ise sadece 17-20 gün aralığındaki çiçek tablaları alındı. Ayçiçeği tablasındaki çiçekcikler dıştan içe doğru farklı günlerde açtıkları için tozlama sonrası belli bir günde alınan çiçek tablalarında farklı gelişme aşamasında bulunun embriyolar mevcuttur. Dışta kalan çiçekciklerden oluşan embriyolar görece iç kısımdakilerden daha olgundurlar.

Tablo 4.7. Tozlama sonrası çiçek kafası hasat tablosu.

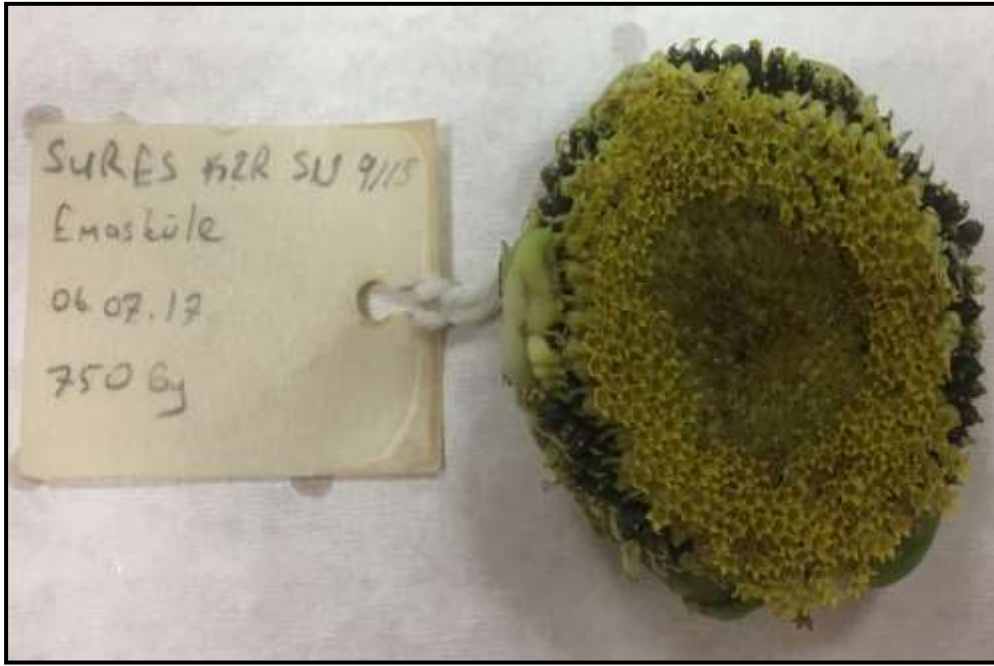
Işınlama Tarihi	Tozlama Tarihi	12. Gün	13. Gün	14. Gün	15. Gün	16. Gün	17. Gün	18. Gün	19. Gün	20. Gün
30.06.2017	30.06.2017	H1 - H4	H5 - H8	H9 - H13	H14 - H16					
06.07.2017	06.07.2017	H17 - H19	H20 - H22	H23 - H27	H28 - H30	H32 - H35				
	07.07.2017			H31		H36 - H39	H40			
	11.07.2017					H41 - H44				
	14.07.2017			H45 - H47						
17.07.2017	17.07.2017	H48 - H52	H53 - H55	H56 - H58	H59 - H61					
17.07.2017	21.07.2017							H62 - H65	H66 - H69	H70 - H75
28.07.2017	28.07.2017						H76		H77 - H78	
	03.08.2017									H79 - H81

4.4.2. Besin Ortamları ve Kültür Koşulları (Embriyo Kurtarma)

Çiçek kafaları tozlaşma sonrası 12. gün itibariyle günlük olarak, her ışınlama dozundan en az bir kafa olacak şekilde hasat edilip aynı gün içinde Edirne'den İstanbul'a gönderildi ve kafalara aynı gün içerisinde embriyo kurtarma işlemi uygulandı. Çiçek kafaları torbaları ile birlikte kesildi, yolda kurumasını önlemek için torbalar ile beraber ıslatılan çiçek kafalarını soğuk tutmak için kargo içerisine buz aküleri de eklendi. Laboratuvara ulaşan çiçek kafaları etiketleri ile birlikte fotoğraflandıktan sonra tohumlar ayıklandı (**Şekil 4.64**).



Şekil 4.64. Laboratuvara transferi sağlanan çiçek tablaları.



Şekil 4.64.ün devamı. Laboratuvara transferi sağlanan çiçek tablaları.



Şekil 4.64.ün devamı. Laboratuvara transferi sağlanan çiçek tablaları.



Şekil 4.64.ün devamı. Laboratuvara transferi sağlanan çiçek tablaları.

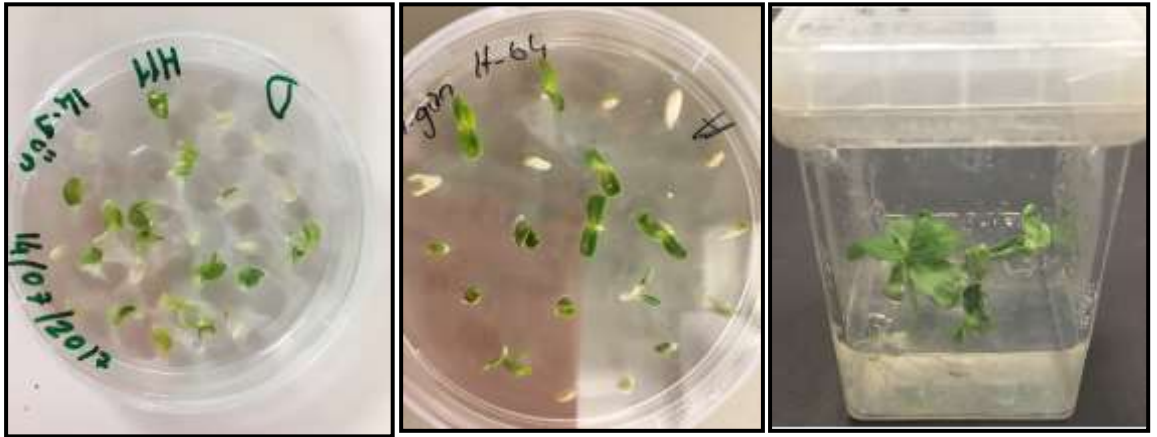
Aseptik kültür öncesi tohumların çenekleri ayrılarak binoküler mikroskopta embriyo aşaması ve embriyo oluşup oluşmadığı belirlendi. Hem zayıf, hem endospor dokusu gelişmiş tohumlarda embriyo gözlemlendi ancak ışınlamadan sonraki günlerde yapılan tozlamalardan elde edilen tohumlarda embriyo oluşumunun oldukça düştüğü belirlendi.

Kuruyan tohumlar steril pensler ile açılarak içerisindeki embriyolar endospermli ile beraber çıkartılıp besi ortamına alındı. Besi ortamı için A, D ve FM (FM1, FM2, FM3 olarak kodlanan üç farklı prosedür kullanıldı ve prosedürler rejenerasyon başarılarına göre değerlendirildi (**Tablo 4.8**). En yüksek çimlenme oranı D besi ortamında %5,5 olarak elde edildi, A ve FM prosedürlerinin çimlendirme başarısı ise sırasıyla %5,4 ve %1,8 olarak belirlendi. Toplamda ise 13045 embriyo kültüre alınmış 617 adedi çimlenmiştir (Çimlenme %4,73).

Tablo 4.8. Embriyo kurtarma çalışmalarında kullanılan A, D ve FM kodlu besin ortamlarında elde edilen çimlenme oranları.

İslah Hatları		Kültüre Alınan Embriyo Sayısı			Çimlenen Embriyo Sayısı					
		A	D	FM	A	%	D	%	FM	%
1	IMI K2R SN-7/15 Emasküle	96	172	168	4	4,1	9	5,2	7	4,2
2	IMI K2R SN-25/15 Emasküle	340	343	35	41	12,1	15	4,3	7	20
3	IMI K2AD SN-2/15 Emasküle	597	592	0	11	1,84	12	2,03	0	-
4	IMI K2R SN-22/15 Emasküle	279	224	64	85	30,5	67	29,9	27	42,2
5	SURES K2R SN-9/15 Emasküle	116	137	0	8	6,9	6	4,4	0	-
6	SURES K2AD SN-2/15 Emasküle	211	210	1	136	64,5	162	76,8	1	100
7	IMI 044A CMS	2535	2176	1487	8	0,3	7	0,3	3	0,2
8	IMI 069A CMS	1247	1206	809	0	-	1	0,08	0	-
Toplam		5421	5060	2564	293	5,4	279	5,5	45	1,8

Embriyoların çimlenmeleri için gerekli sürenin 1-9 hafta aralığında değiştiği belirlendi, endosperm miktarı fazla olanların çoğunluğu daha erken çimlense de dormansinin kırılması için 8-9 haftaya ihtiyaç duyan görece fazla endosperm dokusuna sahip embriyolar da olduğu tespit edildi. Çimlenen embriyolar magenta kutularındaki besi ortamlarına alınarak altkültürlendi (**Şekil 4.65**). Çimlenmeyen embriyolar 30 günde bir taze ortama alınarak altkültürlendi.



Şekil 4.65. Kültüre alındıktan bir hafta sonra çimlenmiş olan embriyolar.

Kültürler hazırlandıktan sonra 25°C sıcaklık 6000 lux ışık şiddeti olan kültür odasında 16/8 saatlik fotoperiyotta muhafaza edildi. Kültürdeki embriyolar, çimlenen embriyolar ve toprağa şaşırtılan bitkiciklerin hepsi aynı ortamda aynı koşullarda tutuldu. Kültürler günlük olarak

kontrol edilip kontamine olanlar atıldı ya da altkültürlendi, ayrıca çimlenen embriyolar da zaman geçirilmeden altkültürlendi.

Çimlenen her embriyonun ayrı bir kaptaki yetiştirilmesi aklimatizasyon aşamasında kök hasarından kaynaklanan stres ve kayıpları minimuma indirecektir ancak bu seçeneğin yer sıkıntısı ve harcanan sarf malzeme miktarını artırması gibi dezavantajları bulunmaktadır.

Toplam sekiz farklı genotipin (6 emasküle 2 CMS) kullanıldığı araştırmada 500, 750 ve 1000 Gray ışın dozları denenmiştir. Çalışmada tüm genotiplerde toplam 13.045 embriyo elde edilmiştir ve bu embriyoların 617 adedi çimlenerek bitkiye dönüşmüştür. Araştırmada kullanılan H34 (SUREK K2AD SN-2/15 Emasküle 1000 Gy), H43 (IMI 044 CMS 1000 Gy), H53 (044A CMS 750 Gy) ve H77 (IMI 044 CMS 750 Gy) genotiplerinde haploid bitkiler elde edilmiştir. Denemede test edilen üç ışın dozu içinde 750 ve 1000 Gy sonuç verirken 500 Gy uygulanan dozda haploid bitki eldesi için sonuç alınamamıştır.

4.4.3. *In Vitro* Bitki Gelişmeleri ve Dış Koşullara Alıştırma

Kotiledon sonrası 2-4 yapraklı dönemde ve kökleri güçlü görünen bitkicikler toprağa şaşırtılarak aklimatizasyon işlemine başlandı. İlk toprağa şaşırtma işlemi kültürde çimlendikten sonra kontamine olan H11 bitkiciklerine ve sterilitesi bozulmamış H9 bitkiciklerine uygulandı, Bitkicikler toprağa şaşırtıldıktan sonra sulandı ve saksı streç film ile sarılarak hızlı nem kaybetmesi önleni (Şekil 4.66.).



Şekil 4.66. Toprağa şaşırtılan örneklerin streç film ile sarılarak hızlı nem kaybetmesi önlenmesi.

Bitkiciklerin birkaç gün sonra sorunsuz şekilde büyüdüğü gözlenince streç film üzerine delikler açılarak kademeli şekilde saksı içerisindeki havanın nemi düşürüldü ve sonraki birkaç gün içerisinde bitki büyümesinin hala sorunsuzca devam ettiği gözlenince streç film tamamen kaldırıldı. Boyları uzayan ayçiçeklerinin raf lambalarına yakın kısımlarında yanma ve kurumalar gözlenince raflar biraz öne doğru çekilerek ışığın geliş açısı değiştirildi, bu uygulamayla ek olarak bitkilerin uzamalarını kısıtlayan raf mesafesi engeli ortadan kalkmış oldu.

Kültür odasının darlığı ve eldeki fide miktarının fazlalığı sebebiyle bazı saksılara (saksılar yaklaşık 2L toprak içermektedir) 6-7 ye varan sayılarda bitki ekildi. Ayrıca aynı sebepten viyollere ekilen (yaklaşık 100 ml toprağa) bitkilerin daha geniş saksılara şaşırtılması gecikti. Bu durum fideleri strese sokarak erken çiçeklenmeye gitmelerine sebep oldu. On santimetre ile yarım metre arası değişen boylarda bitkilerin çiçeklenmeye yöneldiği gözlemlendi.

Çiçeklenen bitkilerin tomurcukları spontan dihaploid olma ihtimali sebebiyle torbalanarak dışarıdan toz almaları engellendi (**Şekil 4.67.**).



Şekil 4.67. Torbalanan çiçek kafaları.

Saksılar gün aşırı olarak çeşme suyu ile sulandı. Uzayan fidelerin bulunduğu saksılardaki toprak miktarı saksının dibine (fideler toprakla beraber kaldırılarak) ve üzerine toprak eklenerek artırıldı. Viyollerdeki fideler 12-14 litrelik balkon tipi saksılara tekrardan şaşırtıldı. Kasım ayı içerisinde (besi ortamından toprağa şaşırtıldıktan 12-14 hafta sonra) bazı fidelerin sürgün ucu ve çiçeklerden başlayarak yapraklarla devam edecek şekilde kurudukları ve sap

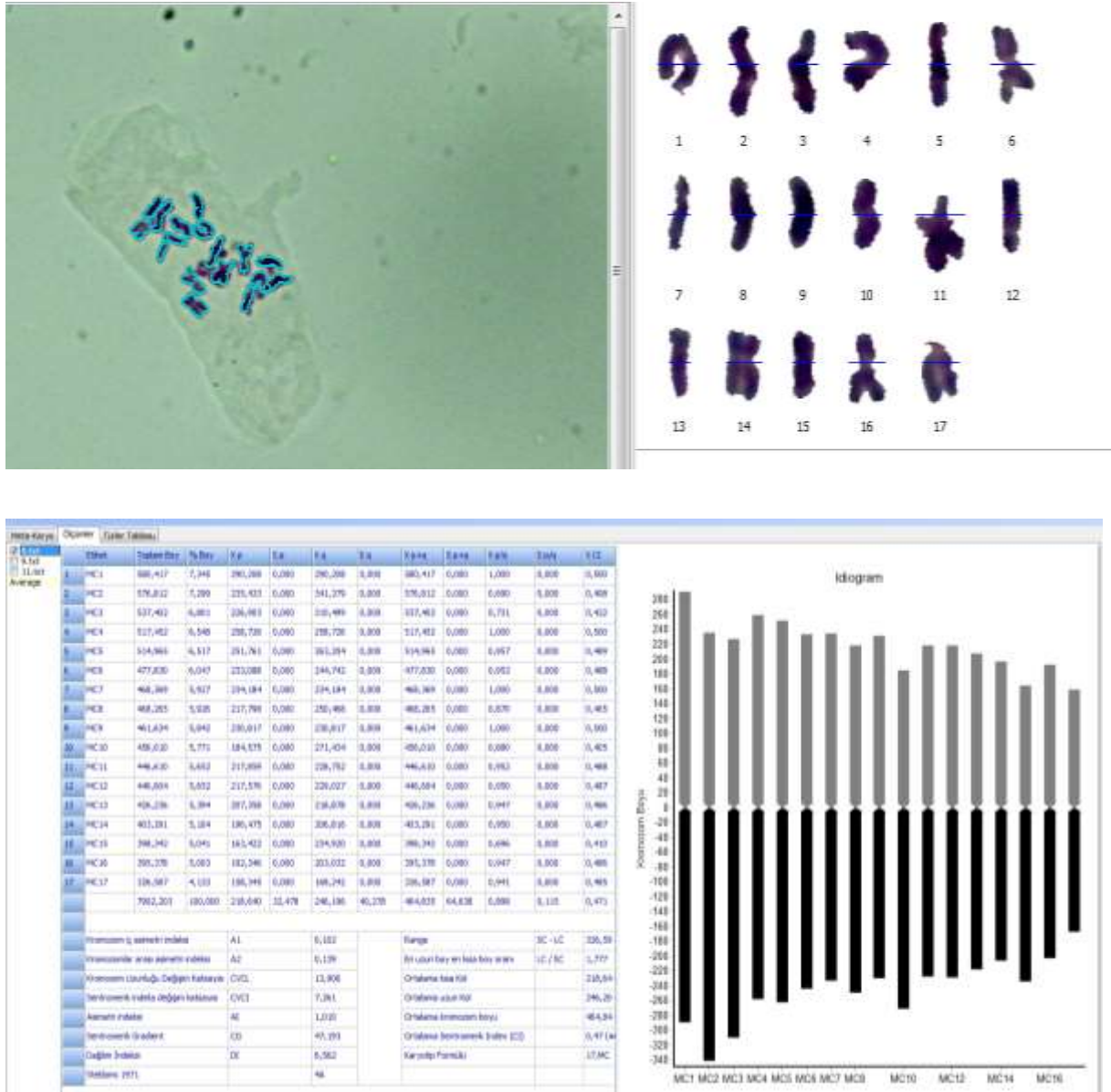
çürümesiydi (toprağa temas halindeki bölgeden). gözlemlendi. Distile su kullanımı bu sorunun çözümünde de yeterli olmayınca fidelerin fungal kaynaklı bir hastalığa yakalandığından şüphelenildi. Bu şüphelerimiz Biyoloji Bölümü Öğretim Görevlilerinden Yard. Doç. Dr. Zeki Severoğlu tarafından doğrulandı ve hastalığın bertarafı için fungusit kullanımına karar verildi. Fidler geniş spektrumlu bir fungusit olan Conrad SC ile spreylenerek ilaçlandı. İlaç solüsyonu 1 ml Conrad SC/1L distile su şeklinde hazırlandı. Uygulamadan 3-4 gün sonra ilacın etkisi olumlu olarak gözlemlendi ancak çok kuruyan bitkiler kaybedilmekten kurtulamadı, ilaç uygulamasından 11 gün sonra kontrol amacıyla yine bir fungusit olan Topas 100EC ile bitkiler ilaçlandı. Çözelti 0,5 ml Topas 100EC/1L distile su konsantrasyonunda hazırlandı. Uygulama sonrası canlılığını devam ettirebilen fiderlerde sürgün uzaması ve yeni yaprak oluşumu gözlemlendi.

Kontaminasyonun tohum ya da toprak kaynaklı olduğu düşünüldü. Bu yüzden bütün saksılar ilaçlama sonrası otoklavlanmış toprak ile en az 1 cm kalınlığında olacak şekilde örtüldü. Besi ortamından otoklavlanmış toprağa şaşırtılan bitkiciklerde ise sap çürümesinin oluşmadığı belirlendi. Kültür odası tamamen boşaltılarak önce ticari yüzey temizleyiciler ile temizlendi, ardından yüzeyler %70'lik ethanol çözeltisi ile spreylenip silindi. Sonra saksı ve kültürler tekrar odaya alındı.

4.5. Ploidi Analizleri ve Dihaploid Bitkilerin Elde Edilmesi

Ploidi analizleri için öncelikle kök uçlarından kromozom sayımı yapıldı. Besi ortamından toprağa şaşırtılan bitkiciklerin kök uçlarından alınan örnekler **“Gereç ve Yöntem” bölümünde detayları verilen ezme preparat yöntemine göre** fikse edildi. Ardından fikse edilen köklerden ezme preparatlar hazırlanarak florasan mikroskopta metafaz aşamasında kromozomları belirgin olan hücrelerde kromozom sayımı yapıldı. Bu işlemin mikroskop ile gözlem aşaması uzun sürdüğü için bütün örneklerle uygulanamadı ama haploid olduğu düşünülen bitkicikler için bir ön değerlendirme yapılmış oldu. Kökten ilk kromozom sayımı 21.07.2017 tarihinde H11 ve H14 kodlu çiçeklerden elde edilen bitkiciklerde yapıldı ve bitkiciklerin diploid olduğu belirlendi. Kromozom sayımı günlük olarak düzenli şekilde uygulanmaya çalışıldı. İlk haploid kromozom sayımı ile H34 numaralı çiçek kafasından alınan embriyodan gelişen bitkide tespit edildi Bu örnekte karyotip analizi de gerçekleştirildi (**Şekil 4.68.**). Ancak bitkicik çok zayıftı ve büyümesini devam ettiremedi.

Başlangıç materyallerinin ploidi seviyelerinin $2n:34$ olduğunun doğrulanması için gerçekleştirilen karyotip analizleri haploid bitki eldesi çalışmaları sonrasında elde edilen bitki örnekleri için de uygulandı.



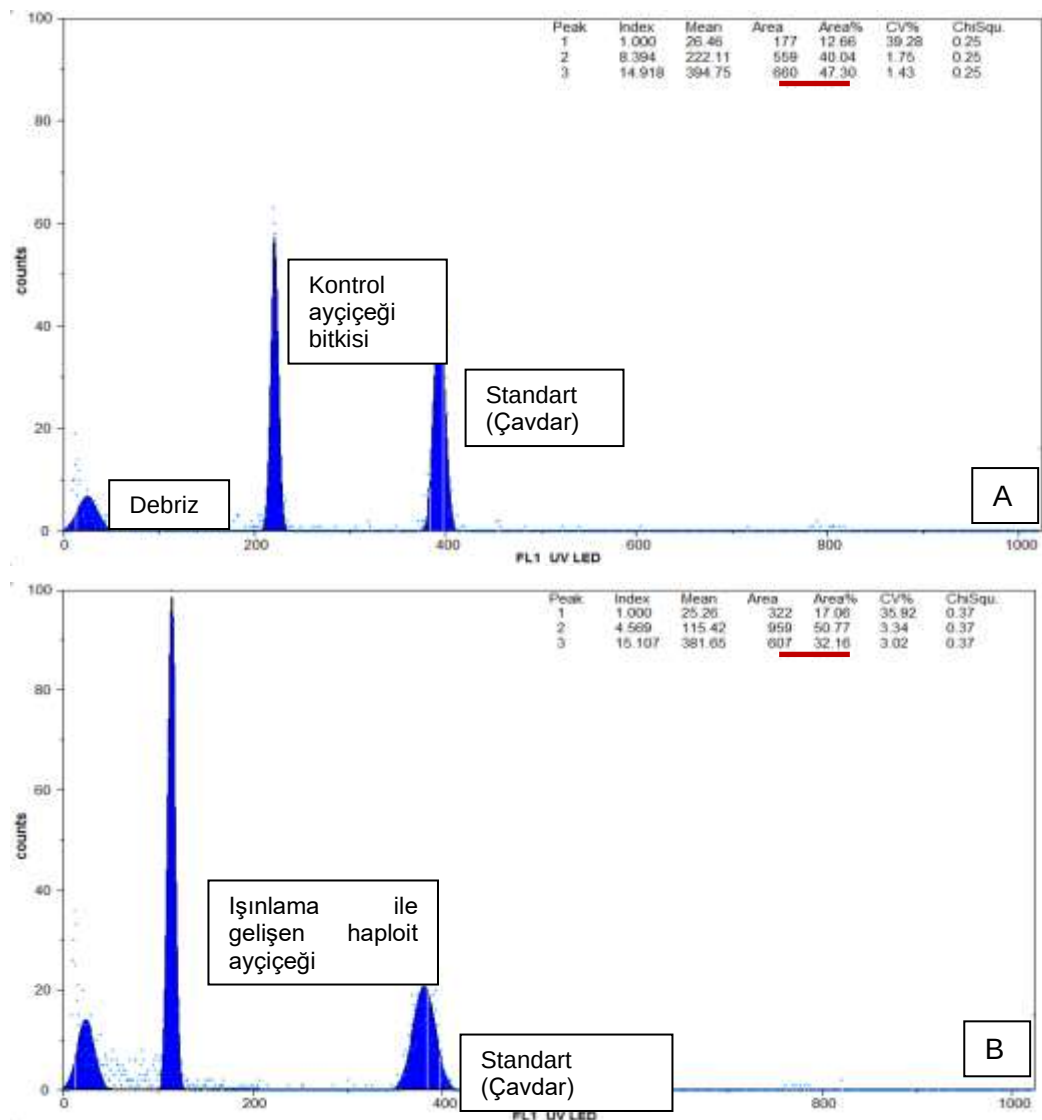
Şekil 4.68. H34 numaralı kaynaktan alınan embriyolardan elde edilen haploid bitkiye ait karyotip analizi.

Flow Analizi

Gelişen bitkilerin ploidi seviyesinin belirlenmesi amacıyla Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Bitki Genetiği ve Sitogenetiği Laboratuvarında bulunan PARTEC (CyFlow Space) Flow sitometri cihazında Ploidi analizleri gerçekleştirildi (**Şekil 4.69,70.**). Projemizin son yılındaki flow analizleri ise Marmara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi öğretim üyesi ve projemizde araştırmacı olarak görev yapan sayın Prof. Dr. Ahu ALTINKUT UNCUGÖLU yönetimindeki Bitki Biyoteknolojisi laboratuvarı altyapısına

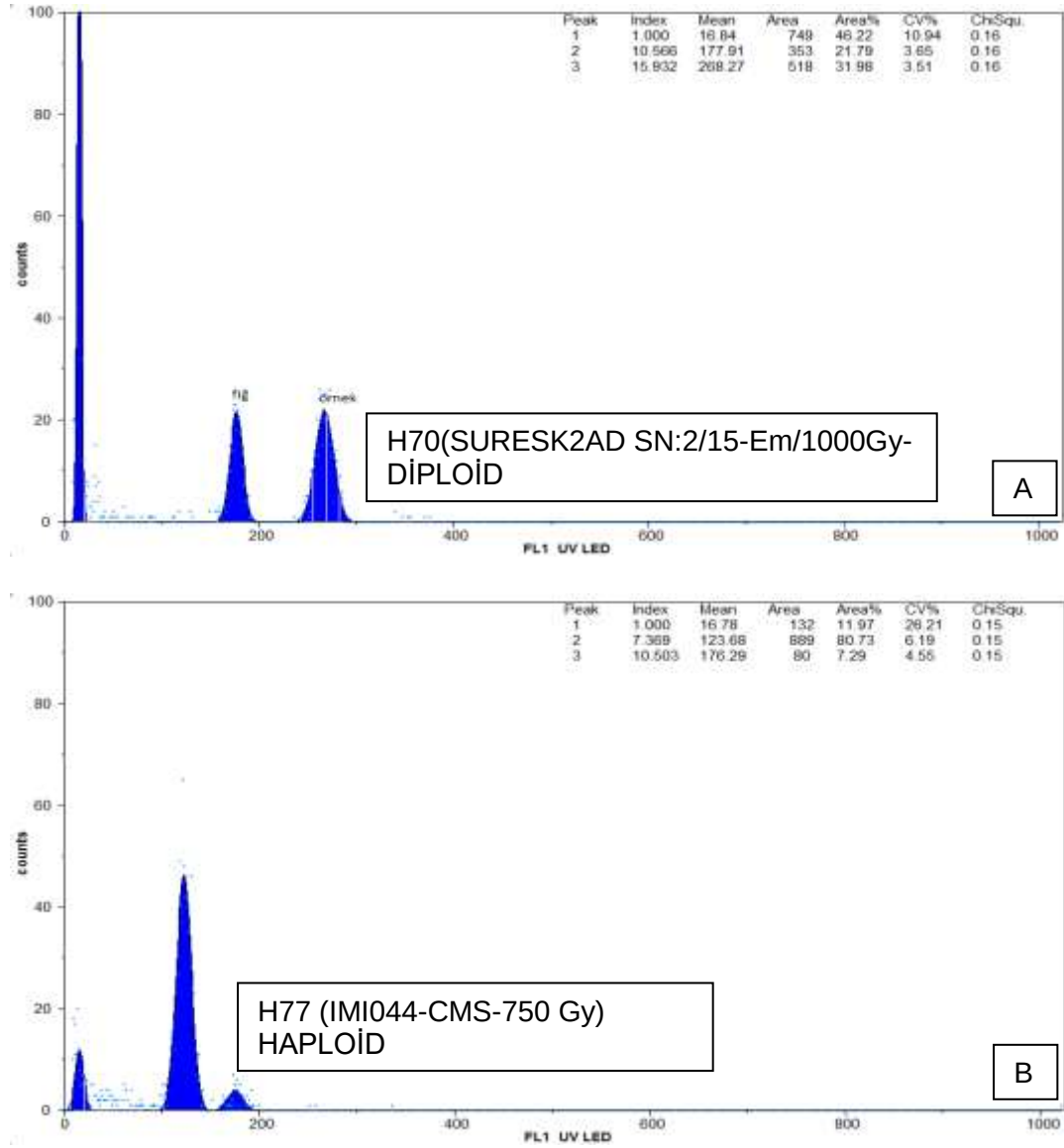
kazandırılan ve Namık Kemal Üniversitesi bünyesindeki cihaz ile tamamen aynı donanıma sahip cihaz ile gerçekleştirildi. Analizlerde standart olarak çavdar bitkisi kullanıldı ve 1 birim örnek - 5 birim çavdar DAPI ile hazırlandı. Soldaki pikler örneği sağdaki pikler çavdarı göstermektedir.

Uygulamanın bir gün öncesinden, yaprak örnekleri, içerisinde filtre kağıdı bulunan plastik petri kaplarında ıslatılarak muhafazaya alındı. Fideler alınan örneğe göre numaralandırılıp etiketlendi, kültür kabında olan bitkilerin kaplarına not düştü. Petriler strafor bir taşıyıcı içerisinde etraflarına buz aküleri konarak soğuk tutuldu. Geceyi soğutucuda geçiren örnekler ertesi gün yine buz aküleri ile soğuk tutularak Tekirdağ'a götürüldü. İlk analiz 07.09.2017 tarihinde diğer iki analiz ise 05.10.2017 ve 15.11.2017 tarihlerinde yapıldı.



Şekil 4.69. Kontrol ayçiçeği bitkisinde (A) ve Işınlanmış (1kilogram) polenlerden partenogenetik gelişen tohumlardan rejenerasyonu sağlanan bitkide (IMI 044-CMS) (B) flow analizi sonuçları.

İlk uygulamada 43 örnekte ploidi analizi yapıldı ve hepsinin 2n kromozoma sahip olduğu belirlendi. Emasküle hatlar için kendillenme olasılığı her zaman olduğundan bu hatlarda 2n bitkiye rastlamak mümkündür.

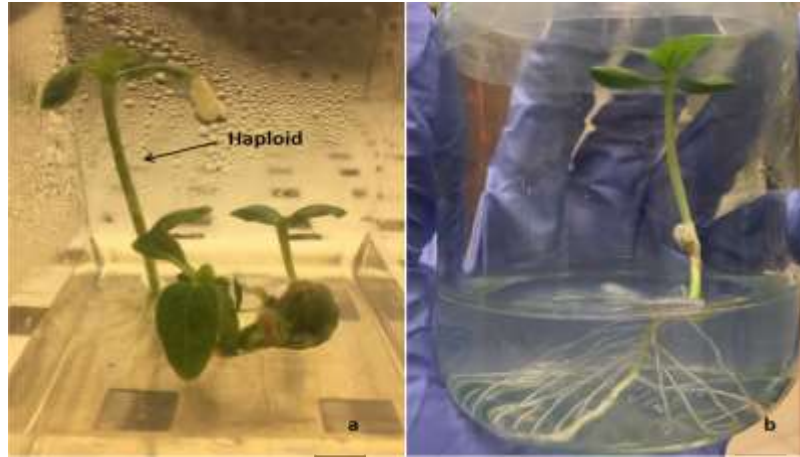


Şekil 4.70. Kontrol ayçiçeği bitkisinde (A) ve Işınlanmış (1kilogray) polenlerden partenogenetik gelişen tohumlardan rejenerasyonu sağlanan bitkide (B) flow analizi sonuçları.

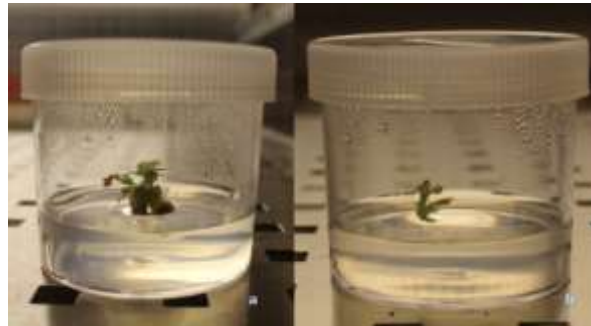
İkinci grupta analize götürülen örnekler (#43) bir önceki uygulama ile aynı şekilde hazırlanarak etiketlendi ve muhafaza edildi. Bu analizde H77 (iki adet-**Şekil 4.71 a-b-c**), H53 ve H43 numaralı kaynaklardan alınıp çimlenen bitkiciklerden 4 tanesinin haploid olduğu belirlendi (**Şekil 4.72a,b-4.73a,b**).



Şekil 4.71. a)Besi ortamında çimlenen haploid H77 **b)**Saksıda 2 haftalık hali **C)**Bir aylık hali.



Şekil 4.72. a)H77 hattından elde edilen haploid, **b)**H53 hattından elde edilen haploid, iki bitkicik de toprağa şaşırtma aşamasında kaybedildi.



Şekil 4.73. a)H43 hattından elde edilen haploid bitkiciğin ana sürgünü, **b)**Aynı bitkiciğin yan sürgünü

Üçüncü grupta götürülen örneklerin (#24) bütün örneklerin diploid olduğu belirlendi. Hastalık sonrası kalan örneklerin flow sitometri analizleri Marmara Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Bitki Biyoteknolojisi laboratuvarına alınan flow sitometri cihazında devam edildi.

H53 ve H77 numaralı hatlardan elde edilen haploidler () hastalık sebebiyle toprağa şaşırtma aşamasında kaybedildi. H43 numaralı hattan elde edilen haploidin ise kontaminasyon sebebiyle genotip kaybını önlemek amacıyla bitkiciğin yan sürgün ayrılarak başka bir kapta kültüre alındı ve ana sürgün ile birlikte köklendirme çalışmaları devam etmekte.

Kolşisin Uygulaması:

Saksıdaki haploid fidelere analiz sırasında tomurcuklanmış olduğu için ana sürgüne kolşisin uygulaması yapılamadı. Bunun yerine iki adet yan sürgününe kolşisin uygulandı. Ana sürgündeki tomurcuk da yeni sürgün gelişimini indüklemek için kopartıldı ve birkaç gün sonra bu kısma da kolşisin uygulandı (**Şekil 4.74.**). Ana sürgün ucunda kopartılan tomurcuk yerine de sürgün yerine tomurcuk gelişimi oldu. Kolşisin uygulanan tomurcukların flow sitometri analizi sonucunda yine haploid olduğu belirlendi.



Şekil 4.74. H77 yan sürgünlerine kolşisin çözeltisi emdirilmiş pamuk uygulaması.

4.6.Dihaploit Bitkilerin Dayanıklılık Testleri İle Doğrulanması

Haploid tekniğiyle elde edilen ve sonra dihaploid olarak saksılara aktarılan bitki tohumları Trakya TAE bitki büyütme odasında yetiştirilmiştir. Yetiştirilme esnasında IMI grubu herbisit uygulanmış ve dayanıklı olanlar belirlenmiştir. SU grubu herbisitlere dayanıklı materyalde haploid bitkiler elde edilememiştir. Ayrıca saksılara ekilirken orobanş bulaştırılmış ve dayanıklı tek bitkiler belirlenmiştir. Bu çalışmalar kış döneminde büyütme odasında yapıldığından dolayı az miktarda tohum elde edilmiştir. Proje sonrasındaki yeni sezonda bu dayanıklı dihaploid bitkilerin tohum çoğaltımı yapılarak test hibritleri de oluşturulacaktır.

Büyütme odasında yetiştirilen materyal:

1. H11/IMI-K2-R-SN-7/15 (750 gray doz uygulanan restorer materyal), iki adet bitki elde edilmiştir. Elde edilen bitkiler IMI grubu herbisitlere ve orobanşa dayanıklıdır. (H4, H11).



2. H68/IMI-K2-R-SN-22/15 (750 gray doz uygulanan restorer materyal), dört adet bitki elde edilmiştir. Elde edilen bitkiler IMI grubu herbisitlere ve orobanşa dayanıklıdır. (H68).



3. H70/IMI-K2-AD-SN-2/15 (1000 gray doz uygulanan ana-maintanier materyal), iki adet bitki elde edilmiştir. Elde edilen bitkiler IMI grubu herbisitlere ve orobanşa dayanıklıdır. (H65).



5. TARTIŞMA/SONUÇ

Bu kombinasyonlarda eş zamanlı olarak anter ve mikrospor kültürü tekniği ile haploid ve dihaploid hatların elde edilmesi, flow sitometri yöntemiyle haploid ve dihaploid hatların seleksiyonu, kromozom analizleri ve elde edilen dihaploid bitkilerin orobanş dayanıklılığı ve herbisit dayanıklılıkları açısından kontrol testleri gerçekleştirilmiştir.

5.1. Haploid Bitkilerin Elde Edilmesi

Tamamlanan bu proje kapsamında daha önce TTAE tarafından proje öncesinde melezlenmiş ve herbisitlere dayanıklılık bakımından heterezigot durumdaki farklı kombinasyonlara ait F_3 bitkileri materyal olarak kullanıldı. Haploid bitki elde edilmesi çalışmaları kapsamında *invitro* **anter ve mikrospor kültürü çalışmaları** gerçekleştirildi. Anter ve mikrospor kültürleri için hem bitki yetiştirme odası hem de tarla koşullarında yetiştirilen bitkilerde uygun başlangıç materyali olan çiçek tomurcuklarının (henüz olgunlaşmamış ve içerisinde birinci polen mitozu aşamasına gelmiş tek çekirdekli mikrosporları bulunduran anterleri içeren tomurcuk-kapitulum) seçimi, çiçek tomurcuklarına ön soğuk uygulaması, çiçek tomurcuklarının sterilizasyonu, anter ve mikrosporların besi ortamlarına transferi ile organ rejenerasyonu çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Bitki büyütme odasında yetiştirilen ayçiçeği anter kültüründe ön uygulama, oksin çeşidi ve genotiplerin androgenik bitki oluşumuna etkisini belirlemek için; 7 farklı ön uygulama (24 saat, 48 saat, 72 saat +4 °C soğuk ve 2gün, 4ün, 8 gün, 12 gün +35 °C sıcak ön uygulama), 3 farklı oksin çeşidi (MS1 (0.5 mg/L MS1, 0.5 mg/L BAP), IAA (0.5 mg/L IAA, 0.5 mg/L BAP), 2.4D (0.5 mg/L 2.4D, 0.5 mg/L BAP)), 4 farklı genotip G1: İMİ-K0-R-SN-7/13, G2: İMİ-K3-R-SN-8/13, G3: SURES K5-R-SN-4/13, G4: SURES-K0-AD-SN-1/13 kullanılmıştır. Bu kapsam da en iyi sonuç veren ayçiçeği genotipleri, besin ortamı kompozisyonları ve ön uygulamalar belirlenmiştir. Yapılan ön uygulamaların kallus, embriyojenik kallus ve rejenerasyon verileri incelendiğinde androgenik bitki üretiminde sıcak ön uygulamanın soğuk ön uygulamaya göre daha etkin olduğu saptanmıştır. Kallus oluşturma yüzdesi en yüksek (%62) G4 en düşük (%54) G1 genotipine ait iken embriyojenik kallus parametresi için en yüksek yüzde (%37) G3 en düşük (%14) G2 genotipine aittir. En iyi rejenerasyon (%10.42) G1 genotipinde oranı en düşük rejenerasyon oranıysa G2 genotipindedir. Androgenik bitki üretime en iyi cevap verenin G3 genotipi olduğunu söyleyebiliriz.

Bitki büyüme düzenleyicileri arasında kallus ve embriyojenik kallus oluşturma yüzdesi en yüksek olan oksin (%65-33) 2.4D (0.5 mg/L 2.4D, 0.5 mg/L BAP) en düşük olan oksin ise (%43-20) IAA (0.5 mg/L IAA, 0.5 mg/L BAP) içerikli besin ortamındadır. En iyi rejenerasyon oranı (%7,1) MS1 (0.5 mg/L MS1, 0.5 mg/L BAP), en düşük rejenerasyon oranıysa (%6,5)

2.4D (0.5 mg/L 2.4D, 0.5 mg/L BAP) içerikli besin ortamındadır. Bu verilere dayanarak MS1 (0.5 mg/L MS1, 0.5 mg/L BAP) bitki büyüme düzenleyicisi içeren besin ortamlarının androgenik bitki üretiminde etkili olduğu belirlenmiştir.

Tüm bu etkenlerin birbiriyle etkileşimi incelendiğinde ise G3 genotipine ait 12 gün +35 °C sıcak uygulama ile MS1 (0.5 mg/L MS1, 0.5 mg/L BAP) oksin çeşidi içerikli besin ortamının en iyi yanıt veren kombinasyon, G2 genotipine ait 24 saat +4 °C soğuk uygulama ile IAA (0.5 mg/L IAA, 0.5 mg/L BAP) oksin çeşidi içerikli besin ortamının en kötü yanıt veren kombinasyon olduğu saptanmıştır.

Projemizde bitki yetiştirme odasında büyütülen bitkilerde gelişen kapitulumlardan elde edilen uygun evredeki anterlerin az sayıda ve beklenen kalitede olmaması, bu anterlerden izole edilen mikrosporlarda hedeflenen yoğunluğa ulaşılamaması gibi nedenlerden dolayı danışmanlarımızın da önerisi ile projemizde başlangıç materyali olan kapitulumların bitki yetiştirme odasında değil de tarla koşullarında elde edilmesinin uygun olacağına karar verilmiştir.

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde tarla koşullarında yetiştirilen bitkilerden alınan çiçek tomurcuklarının hem anter (uygun evrede mikrospor içeren yeterli sayıda) hem de mikrospor (yeterli yoğunlukta) kültürü için daha uygun olduğu görüldü. En iyi kallus yüzdesini (51,25) A2 besiyeri verirken, en iyi embriyogenik kallus yüzdesini (%75,63) yine A1 besiyerinde elde edilmiştir. Genotip baz alarak bakıldığında ise en iyi kallus yüzdesini (%62,5) İMİ-K2- AD-SN-2/15 genotipi verirken en iyi embriyogenik kallus yüzdesini (%100) SURES-K2- AD-SN-2/15 genotipi vermiştir. Bu kapsamda farklı ön uygulamalar, besin ortamları ve genotiplerin anter kültüründeki etkileri değerlendirildiğinde en iyi rejenerasyon oranlarının 12 gün +35 °C sıcak ön uygulama (%78.1), A4 içerikli besin ortamı (%38.29) ve G4 genotipinde (%71.43) elde edildiği belirlenmiştir.

Ayçiçeğinde **mikrospor kültürü** ile haploid bitki elde edilmesi için ayçiçeği ve diğer bitkilerde daha önce uygulanmış dört farklı mikrospor kültürü protokolü uygulanmıştır. Bu dört farklı protokolden yalnızca Protokol 4 (Özsan, 2014)'de diğer protokollerden farklı olarak anterlere ön uygulama yapılmıştır. Çalışılan bu protokollerde mikrospor izolasyonu için yeterli sayıda çiçekçiklerin izole edilebilmesi, kapitulum büyüklükleri, besiyeri içerikleri, uygun mikrospor safhası, genotip, embriyo oluşumunu uyarıcı sıcaklık ve mannitol ön uygulamaları gibi farklı parametreler optimize edilmeye çalışılmış ve bunların mikrospor kültürü sonuçlarına etkileri incelenmiştir.

Yapılan çalışmalar sonucunda sadece Protokol 2 (Mohammadi, 2011) ile yapılan çalışmada kallus elde edilmiştir. Ancak bu kallusun bulunduğu kültür ortamı kontaminasyondan dolayı daha sonra kaybedilmiştir. Bu protokollerde kullanılan NLN besiyerinde bulunan yüksek oranda sukrozun sekonder metabolitlerin oluşumuna sebep olarak kültürlerde

kontaminasyona sebep olabileceği düşünülmüştür.

Tarladan ve bitki yetiştirme odasından elde edilen kapitulumlarla yapılan androgenik kültür çalışmalarında hem kapitulumların büyüklüğü hem de bu kapitumlardan elde edilen çiçekçik sayısının farklı olması ve de tarladan elde edilen kapitulumların daha hızlı gelişmesi bu iki kapitulum materyali arasında önemli farklılıklar ortaya koymuştur. Tarladan elde edilen kapitulumların boyutları bitki yetiştirme odasından elde edilen kapitulum boyutlarına göre daha büyüktür. Dolayısıyla tarladan elde edilen kapitumlardan elde edilen çiçekçik sayısı daha fazla olmaktadır. Uygulanan protokollerde mikrospor izolasyonu için istenilen ortalama 30-40 çiçekçik tarladan elde edilen kapitumlarda sağlanmıştır. Ancak bitki yetiştirme odasında elde edilen kapitumlarda çiçekçik sayısı, genotipe göre değişkenlik göstermekle birlikte, ortalama 10 çiçekçik kadardır.

Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü (TTAE) tarafından yürütülen ülkesel ayçiçeği ıslah proje materyali kullanılarak gerçekleştirilen androgenik doku kültürü çalışmaları kapsamında anter kültürü ile sürgün rejenerasyonu ve toprağa adaptasyonu, mikrospor kültürüyle kalllus rejenerasyonu elde edilmiştir.

Projemizin 2. gelişme raporu dönemine gelindiğinde bu rapor dönemine kadar anter ve mikrospor kültürü çalışmaları ile haploid bitki elde edilememesi nedeniyle proje önerimizde anter ve mikrospor kültürü ile haploid bitkilerin elde edilememesi durumunda B planı olarak ışınlanmış polen uyartımıyla ve ışınlanmış polenlerle dişi çiçeklerin tozlanması yoluyla haploid bitki elde edilmesi yoluna gidileceği ve uyartım sonucu oluşan haploid embriyoların bitkiye dönüştürülebilmesi için de devamında embriyo kültürü yöntemi uygulanacağı bilgisine yer verilmiştir. Bu nedenle 2017 Nisan döneminde ışınlanmış polenlerle dişi çiçeklerin tozlanması yoluyla haploid bitki elde edilmesi çalışmalarına başlanmıştır. Bu kapsamda proje paydaşlarından olan Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü'ne ait araziye proje tarla materyali restorer IMI-K2-R-SN-7/15, IMI-K2-R-SN-22/15, IMI-K2-R-SN-25/15 hatlarının ekimi Nisan 2017 döneminde, SURES-K2-AD-SN-2/15, SURES-K2-R-SN-9/1, IMI-K2-AD-SN-2/15 restorer hatlarının ekimi Mayıs 2017 döneminde gerçekleştirilmiştir. Ayrıca projeye CL 069 A ve IMI 044 A materyali de dahil edilerek (stoplazmik erkek kısır hatlar) yöntemin başarısının belirlenmesine katkı sağlanmıştır. Bu hatlar CMS olduğundan emasküle edilmesine gerek yoktur.

Toplam sekiz farklı genotipin (6 emasküle 2 CMS) kullanıldığı araştırmada 500, 750 ve 1000 Gray ışın dozları denenmiştir. Çalışmada tüm genotiplerde toplam 13.045 embriyo elde edilmiştir ve bu embriyoların 617 adedi çimlenerek bitkiye dönüşmüştür. Araştırmada kullanılan H34 (SURES K2AD SN-2/15 Emasküle 1000 Gy), H43 (IMI 044 CMS 1000 Gy), H53 (044A CMS 750 Gy) ve H77 (IMI 044 CMS 750 Gy) genotiplerinde haploid bitkiler elde

edilmiştir. Denemede test edilen üç ışın dozu içinde 750 ve 1000 Gy sonuç verirken 500 Gy uygulanan dozda haploid bitki eldesi için sonuç alınamamıştır.

5.2. Dihaploid Bitkilerin Elde Edilmesi

Haploid olduğu belirlenip sağlıklı şekilde aklimatizasyonu sağlanan bitkilerin dihaploid hale gelmesi için apikal uçları %2 DMSO içeren %0,15'lik kolşisin çözeltisi emdirilmiş pamuklar ile 5 saat muamele edildi (Yan et al. 1985). Uygulama sonrası uygun boyuta ulaşan yapraklardan örnek alınarak flow-cytometry yöntemi ile tekrar ploidi analizi yapıldı ve örneklerin hala haploid oldukları görüldü.

Diğer taraftan Işınlanmış polen ile tozlama sonrası embriyo kültürü çalışmaları ile flow analizi ile diploid oldukları belirlenen ve toprağa alıştırılan IMI-K2-R-SN-7/15, IMI-K2-R-SN-22/15 ve IMI-K2-AD-SN-2/15 bitkilerden tohum alınarak rejenerasyon süresi kısaltılmıştır. Bu diploid bitkilerin aslında kendiliğinden katlanarak gelişen dihaploid bitkiler olduğu görüldü. Dihaploid olduğu belirlenen bitkilerden fertil olanlarının çiçekleri torbalanarak kendillenmeleri sağlandı.

5.3. Haploit ve Dihaploid Bitkilerin Ploidi Düzeylerinin Belirlenmesi

Elde edilen bitkilerin yaprak dokularından ploidy düzeyleri flow sitometri yöntemiyle, çekirdek DNA içeriklerinden yararlanılarak saptanmıştır. Flow sitometriyle çekirdek DNA analizlerinin bir kısmı, Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Bitki Genetiği ve Sitogenetiği Laboratuvarında bulunan PARTEC (CyFlow Space) marka Flow sitometri cihazı kullanılarak gerçekleştirildi, bir kısmı ise Marmara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü Bitki Biyoteknolojisi ve Proteomiks Laboratuvarında bulunan aynı model Flow sitometri cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Örnekler İstanbul'dan Tekirdağ'a buz aküleri ile soğutularak taşınmıştır. Ölçümlerde standart olarak çavdar kullanılmıştır.

Gelişen bitkilerin ploidi seviyesinin belirlenmesi amacıyla Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Bitki Genetiği ve Sitogenetiği Laboratuvarında bulunan PARTEC (CyFlow Space) Flow sitometri cihazında Ploidi analizleri gerçekleştirildi (Şekil 4.61.). Analizlerde standart olarak çavdar bitkisi kullanıldı ve 1 birim örnek - 5 birim çavdar DAPI ile hazırlandı. Soldaki pikler örneği sağdaki pikler çavdarı göstermektedir.

Uygulamanın bir gün öncesinden, yaprak örnekleri, içerisinde filtre kağıdı bulunan plastik petri kaplarında ıslatılarak muhafazaya alındı. Fideler alınan örneğe göre numaralandırılıp etiketlendi, kültür kabında olan bitkilerin kaplarına not düşüldü. Petriler strafor bir taşıyıcı içerisinde etraflarına buz aküleri konarak soğuk tutuldu. Geceyi soğutucuda geçiren örnekler ertesi gün yine buz aküleri ile soğuk tutularak Tekirdağ'a götürüldü. İlk analiz 07.09.2017 tarihinde diğer iki analiz ise 05.10.2017 ve 15.11.2017 tarihlerinde yapıldı.

İlk uygulamada 43 örnekte ploidi analizi yapıldı ve hepsinin 2n kromozoma sahip olduğu belirlendi. Emasküle hatlar için kendillenme olasılığı her zaman olduğundan bu hatlarda 2n bitkiye rastlamak mümkündür. Beş Ekim'de gerçekleştirilen ikinci analize yine 43 örnek götürüldü. Bu analizde H77 (iki adet), H53 ve H43 numaralı kaynaklardan alınıp çimlenen bitkiciklerden 4 tanesinin haploid olduğu belirlendi.

5.4. Dihaploit Bitkilerin Dayanıklılık Testleri İle Doğrulanması

Haploid tekniğiyle elde edilen ve sonra dihaploid olarak saksılara aktarılan bitki tohumları Trakya TAE bitki büyütme odasında yetiştirilmiştir. Yetiştirilme esnasında IMI grubu herbisit uygulanmış ve dayanıklı olanlar belirlenmiştir. SU grubu herbisitlere dayanıklı materyalde haploid bitkiler elde edilememiştir. Ayrıca saksılara ekilirken orobanş bulaştırılmış ve dayanıklı tek bitkiler belirlenmiştir. Bu çalışmalar kış döneminde büyütme odasında yapıldığından dolayı az miktarda tohum elde edilmiştir. Proje sonrasındaki yeni sezonda bu dayanıklı dihaploid bitkilerin tohum çoğaltımı yapılarak test hibritleri de oluşturulacaktır.

Büyütme odasında yetiştirilen materyal:

1. IMI-K2-R-SN-7/15 (750 gray doz uygulanan restorer materyal -H4, H11-), **2 adet dihaploid** bitki elde edilmiştir. Elde edilen bitkiler IMI grubu herbisitlere ve orobanşa dayanıklıdır.
2. IMI-K2-R-SN-22/15 (750 gray doz uygulanan restorer materyal -H68-), **4 adet 2 adet dihaploid** bitki elde edilmiştir. Elde edilen bitkiler IMI grubu herbisitlere ve orobanşa dayanıklıdır.
3. IMI-K2-AD-SN-2/15 (1000 gray doz uygulanan ana-maintanier materyal -H65-), **2 adet dihaploid** bitki elde edilmiştir. Elde edilen bitkiler IMI grubu herbisitlere ve orobanşa dayanıklıdır.

Proje sonucuna göre çalışmalardan proje amacına uygun herbisit ve orobanş herbisitine dayanıklı 8 adet imi grubu herbisitlere ve orobanşa dayanıklı dihaploid bitki elde edilmiştir.

Ayrıca elde edilen bu tek bitkilerin genetik tabanında mildiyö hastalığına dayanıklılık geni mevcuttur. Proje sonrasında tohum çoğaltımı tamamlandıktan sonra inokülasyon yoluyla mildiyö hastalığına karşı test edilerek dayanıklılar belirlenecektir. Mildiyö hastalığı inokülasyon yoluyla test çalışmalarında fazla sayıda tohum gerekmektedir.

Projenin ana amaçlarından birisi, ayçiçeğinde haploid tekniğini başarılı bir şekilde uygulamak ve bu konuda protokol oluşturmaktır. Proje sonunda ışınlanmış polen kültürü tekniği ile başarılı bir şekilde haploid bitkiler ve bunlardan da dihaploid bitkiler elde edilmiş, protokol

oluşturulmuştur. Bundan sonra ayçiçeği ıslahında projede oluşturulan protokole göre haploid tekniği kullanılarak ıslah çalışmaları yapılabilecektir.

Dihaploit hatların elde edilmesine yönelik tekniğinin kullanılması ile ülkesel ıslah projesinin diğer ülke ıslah programlarıyla rekabet gücü artmış olacaktır. Bitki ıslahı çalışmalarında tercih sebebi olan dihaploit hatların oluşturulması ve bunların çeşitli biyotik ve abiyotik stres etmenlerine dayanıklılık için ıslahta kullanılma potansiyelinin ortaya konması konusunda, ülkemizde çok az sayıda çalışma ve yetişmiş insan gücü vardır. Bu nedenle yürütülen proje ile proje süresince görev alan lisansüstü öğrencilerin ve araştırmacıların bitkilerde sözü edilen yöntemleri öğrenip uygulamaları mümkün olmuş ve bu sayede kritik araştırmacı kitlesinin oluşumuna katkı sağlanmıştır.

Bu proje kapsamında (anter ve mikrospor kültürleri çalışmalarından ayçiçeğinde başarılı sonuç elde edilememiştir) ışınlanmış polen kültürü kullanılarak elde edilen genetik açıdan güvenilir (homozigot dayanıklı) yerli ayçiçeği ebeveyn hatları, projeden sonrada gerçekleştirilecek diğer çalışmalar için kullanılabilir niteliktedir ve ülkemiz tarımına kazandırılacaktır.

Bu noktada proje sonunda elde edilen bilgiler (gerek anter ve mikrospor kültürünün optimizasyonu, gerekse ışınlanmış polen kültürü optimizasyonu ile kendilenmiş saf hatların elde edilmesi), çok sayıda ve nitelikli yeni Ar-Ge projelerinin üretilmesine neden olacak ve ülkemizde yapılacak benzer çalışmalara öncülük edecektir.

Elde edilen dihaploid hatların kombinasyon kabiliyetlerinin iyi çıkması durumunda hatlar tescil edilerek ayçiçeği ıslahında hibrit kombinasyonlarının oluşturulmasında uzun yıllar kullanılabilme potansiyelindedir. İmi herbisitine ve orobanş parazit bitkisine dayanıklı bu dihaploid gen kaynaklarının milli servet değerinde olan gelecekte yapılacak çalışmalara yön verecek olması son derece önemlidir.

6.KAYNAKLAR LİSTESİ

1. Abak K. (1986). Biber Islahında Anter Kültüründen Yararlanma. TUBITAK Bitki Islahı Simpozyumu Bildiri Özetleri. 15-17 Ekim, İzmir. Sayfa:64.
2. Ahmet H, Adak MS. (2007). Irak'ta Yetiştirilen Bazı Ekmeklik Buğday Çeşitlerinde Kallus Oluşumu ve Bitki Rejenerasyonu. Tarım Bilimleri Dergisi 2007, 13 (3), 285-292.
3. Al-Khatib K, Baumgartner JR, Peterson DE ve Currie RS. (1998). Imazethapyr resistance in common sunflower (*Helianthus annuus*). Weed Science, 46: 403–407.
4. Al-Khatib K v Miller J.F. (2000). Registration of four genetic stocks of sunflower resistant to imidazolinone herbicides. Crop Science, 40: 869–870.
5. Alonso C. (1996). New highly virulent sunflower broomrape (*Orobancha cumana* Wallr.) phenotypes in Spain. Advances in parasitic plant research", 6th International Parasitic Weed Symposium. April 16-18, Cordoba, Spain.
6. Alonso C. (1998). Resistance to orobanche and resistance breeding. 4th International Workshop on Orobancha, September, Albena. Bulgaria. 23-26.
7. Alvarez D, Luduena P ve Frutos E. (1992). Correlation and causation among sunflower traits. Proceeding of the 13 th. International Sunflower Conference. Pisa, Italy. 7-11 September, 2: 957-962.
8. Ayçiçeği Raporu (2017) T.C Gümrük ve Ticaret Bakanlığı Kooperatifçilik Genel Müdürlüğü.
9. BASF Reports (2008). Innovations for climate protection.
10. Bennet MD ve Leitch IJ. (1995). Nuclear DNA Amounts in Angiosperms. Annals of Botany 76:113-176.
11. Bidney DL, Scelonge CJ. (1997). Sunflower Biotechnology. In A. A. SCHNEITER (ed.) Sunflower Technology and Production. Agron. Monogr. 35. ASA, CSSA and SSSA, Madison, WI, USA. 559-593. 1997.
12. Bilge E. 1982. Genetik. İstanbul Üniversitesi Yayınları, s:163–316.
13. Budak H, Sherman RC, Parmaksız L, Gaussoin RE, Riordan TP, Dweikat I. (2004). Molecular Characterization of Buffalograss Germplasm using Sequence-Related Amplified Polymorphism Markers. Theor. Appl. Genet., 108: 328-334.

- 14.Cao MQ, Li Y, Liu E, Jiang T, Liu GS, Nishio T, Dore C. (1995). Application of anther culture and isolated microspore culture to vegetable crop improvement. *Acta Horticulturae*, 392: 27-28.
- 15.Cavalier-Smith T. (1985). The evolution of genome size. Chichester: John Wiley and Sons.
- 16.Chaudhary SK ve Anand. (1993) Correlation and path- coefficient analysis in F1 and F2 generations in sunflower (*H. annuus* L.) *International Journal of Tropical Agriculture*, 11 (3):204- 208.
- 17.Christov M, Piskov Al, Encheva J, Valkova D, Drumeva M, Nenova N, Nikolova V, Encheva V, Shindrova P, Petrov P ve Georgiev G. (2009). Developing sunflower hybrid cultivars with increased productivity, resistant to disease and broomrape using classical and biotechnological methods. *Scientetechnical bulletin. Institute for oilseed crops. UOSC*, 14: 74-87.
- 18.Cuellar T, Belhassen E, Fernandez-Calvin B, Orellana J, Bella J. (1996). Chromosomal differentiation in *Helianthus annuus* var. *Macrocarpus*: heterochromatin characterization and rDNA location. *Heredity* 76. 586- 591.
- 19.Cuny F. (1992). Processus d'induction d'embryons haploides par du pollen irradié chez le melon (*Cucumis melo* L.). Response du pollen a l'irradiation gamma. These de Docteur, Spécialité: Biologie et Cytologie Végétales, Univ. D'Avignon et des Pays de Vaucluse, Avignon, 139 p.
- 20.Çağlar G ve Abak K. (1999). Farklı Hıyar Genotiplerinde Işınlanmış Polenlerle Uyartım Yoluyla Haploid Embriyo ve Bitki Eldesi. *Türkiye II. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, Cilt II*. 159–162
- 21.Dias, J.S. and Correia, M.C. (2002) Effect of medium renovation and incubation temperature regimes on *trionchuda* cabbage microspore culture embryogenesis. *Scientia Horticulturae*, 93, 205-214.
- 22.Doležel J, Greilhuber J ve Suda J. (2007). Flow cytometry with plant cells, Analysis of genes, chromosomes and genomes. Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. Weinheim, 454.
- 23.Dunwell JM. (2010). Haploids in flowering plants: Origins and exploitation. *Plant Biotech. J.*, 8: 377-424

- 24.Elavazhagan T, Jayakumar S, Chitravadivu C ve Balakrishnan V. (2009). *In vitro* Culture and Cytological Studies on *Helianthus annus* L. Botany Research International, 2 (4): 258-262.
- 25.Ellialtıoğlu Ş, Sarı N. ve Abak K. (2001). Haploid Bitki Üretimi (Babaoğlu, M., Gürel, E. Ve Özcan, S. editörler), Bitki Biyoteknolojisi-I Doku Kültürü ve Uygulamaları. S.Ü.Vakfı Yayınları, Konya, syf:137-189.
- 26.Ellialtıoğlu Ş, Sarı N ve Abak K. (2000). 374. Haploid Bitki Üretimi. Bitki Biyoteknolojisi Cilt:I, (Babaoğlu M., Gürel E., Özcan S. editörler).
- 27.Emiroğlu Ü. (1982) Haploidi ve Bitki Islahındaki Önemi. Ege Ü.Z.F. Yayınları, Yardımcı Ders Kitabı. Yayın No: 450. Bornova, İzmir.
- 28.Emiroğlu Ü. (1980). Başlıca Türk Tütün Çeşitlerinde (*Nicotiana tabacum* L.) Haploid Bitkilerin Elde Edilmesi ve Bunlar Üzerinde Meiosis ve Karyotip Araştırmaları. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Bornova, 373.
- 29.Evcı G, Sezer N, Pekcan V, Yılmaz Mİ, Kaya Y. (2011). Broomrape control in sunflower production in Turkey. Inter. Symposium on Broomrape (*Orobancha spp.*) Sunflower. Journal of Academy of Science of Moldova. 2 (314): 111-117.
- 30.Evcı G, Pekcan V, Yılmaz Mİ, Kaya Y. (2012). The Resistance Breeding to IMI and SU Herbicides in Sunflower. International Scientific Conference, June 5-6. Plovdiv. Bulgaria.
- 31.Feder N ve O'Brien TP. (1968). Plant microtechnique: some principles and new methods. American Journal of Botany 55: 123-142.
32. Fernández-Martínez J.M.,Pérez-Vich, B., Velasco, L. (2009). Sunflower. In: Vollmann J., Rajcan I. Eds. Oil Crops. Series: Hand Book of Plant Breeding, Vol. 4. Springer, New York, USA. pp: 155-232.
33. Fernández-Martínez JM, Domínguez J, Pérez-Vich B, Velasco L. (2010). Update on breeding for resistance to sunflower broomrape. Helia 33(52): 1–12.
- 34.Ferrie AMR ve Caswell KL. (2011). Isolated Microspore Culture Techniques And Recent Progress For Haploid And Doubled Haploid Plant Production. Plant Cell Tiss Organ Culture, 104:301–309.
- 35.Ferrie AMR ve Keller WA. (1997). Production of Haploids in *Brassica* spp. via Microspor Culture. Plant Tissue Culture Manuel, E6: 1- 17. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- 36.Fick GF. (1978). Sunflower science and technology. Agron. J. 19: 279-338.

37. Fisher DB. (1968). Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. *Histochemie* 16: 92-96.
38. Food And Agriculture Organization Of The United Nations, <http://Fao.Org>, 22.03.2017.
39. Forster BP, Bors EH, Kasha KJ, Touraev A. (2007). The Resurgence of Haploids in Higher Plants. *Trends in Plant Science*, 12(8): 368-375.
40. Friedt W ve Zarhloul MK. (2005). Haploids in the improvement of crucifers, *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, eds: Palmer, C.E., Keller, W.A., Kasha, K.J. Berlin: Springer-Verlag, 191-213.
41. Geier PW ve Stahlman WP. (2001). Grain sorghum (*Sorghum bicolor*) and sunflower (*Helianthus annuus*) response to MKH 6561 and MON 37500 residues in soil. *Weed Technology* 15 (4): 767–770.
42. Germana MA. (2011). Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding. *Plant Cell Rep*, 30:839-857.
43. Guha S ve Maheshwari SC. (1964). In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature*, 204:497.
44. Guo YD ve Pulli S. (2000). Isolated microspore culture and plant regeneration in rye (*Secale cereale* L.). *Plant Cell Rep*. 19: 875-880.
45. Gürel A, Kontowski S, Nichterlein K ve Friedt W. (1991b). Embryogenesis in microspore of sunflower (*Helianthus annuus* L.)", *Helia*, 14(14), 123- 128.
46. Gürel A, Nichterlein K and Friedt W. (1991a). Shoot regeneration from anther culture of sunflower (*Helianthus annuus*) and some interspecific hybrids as affected by genotype and culture procedure. *Plant Breeding*, 106, 68-76.
47. Hatipoğlu R. (1999). Bitki Biyoteknolojisi. Ç.Ü.Z.F. Genel Yayın No:190, Ders Kitapları Yayın No: A-58, Adana. 178.
48. Heller FO. (1973). DNA Measurement of *Vicia faba* L. with the pulse cytophotometry. *Ber. Deutsch. Bot. Gesellsch. Bd.*, 86, 437-441.
49. Islam SMS, Ara I, Tuteja N ve Subramaniam S. (2013). Efficient Microspore Isolation Methods for High Yield Embryoids and Regeneration in Rice (*Oryza sativa* L.). *International Journal of Biological, Life Science and Engineering*, 7:(12).
50. Ivanov P, Encheva J, Nenova N, Todorova M. (2002). Application of some biotechnological achievements in sunflower breeding. *Helia*. 25: 9-18.

- 51.Jocic S, Malidža G, Cvejic S, Hladni N, Miklič V ve Škoric D. (2011). Development of sunflower hybrids tolerant to tribenuron methyl. Genetika, 43: 175–182.
- 52.Kaya Y, Evci G, Pekcan V. ve Gücer T. (2003). Ayçiçeğinde tane ve yağ veriminin oluşumunda etkili verim ve öğelerin katkı oranlarının belirlenmesi, Tarla Bitkileri Kongresi, 13-17 Ekim, 2003, Diyarbakır.
- 53.Kaya MD. (2004). Ayçiçeği Islahında Imidazolinone Dayanıklılık. Doktora Semineri, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Fen Bilimleri Enstitüsü, A.Ü, Mayıs, 24.
- 54.Kaya Y ve Evci G. (2007). The Utilization from Wild Species in Sunflower Breeding. International Research Conference, Plant Genetic Stocks - The Basis of Agriculture of Today, June 13-14. Plovdiv. Bulgaria. 2: 17-19.
- 55.Kaya Y. (2004). Ayçiçeği Biyoteknolojisinde Son Gelişmeler Ve Islahında Kullanım Olanakları. Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi. Trakya Univ J Sci, 5(2): 141-147.
- 56.Kaya Y. (2003a). Ayçiçek Tarımı. Tarım İstanbul, 84, 24-25.
- 57.Kaya Y. (2003b). Ayçiçeğinde Orobanş ve Mücadelesi. Tarım İstanbul, 84, 26-28.
- 58.Kaya Y. (2003c). Türkiye'deki Yağlık Ayçiçeği Üretiminin Mevcut Durumu, Sorunları ve Çözüm Önerileri. Cine Tarım Dergisi, 5:43, 34-35.
- 59.Kaya Y, Evci G, Pekcan V, Gücer T. (2004). Determining new broomrape infested areas, resistant lines and hybrids in Trakya Region of Turkey. Helia, 27: 211-218.
- 60.Kaya Y, Evci G, Pekcan V, Gücer T ve Yılmaz Mİ. (2009). Ayçiçeğinde Yağ Verimi ve Bazı Verim Öğeleri Arasında İlişkilerin Belirlenmesi. Tarım Bilimleri Dergisi, 15(4): 310-318.
- 61.Kaya Y, Evci G, Pekcan V, Yılmaz Mİ. (2012b). The resistance breeding to broomrape parasite and other stress conditions in sunflower. Proc. 41st Annual Meeting of ESNA, September 24-28, Stará Lesná, High Tatras, Slovak Republic. 78.
- 62.Kaya Y, Evci G, Pekcan V, Gücer T ve Yılmaz İ. (2009). Ayçiçeğinde Yağ Verimi Ve Bazı Verim Öğeleri Arasında İlişkilerin Belirlenmesi. Tarım Bilimleri Dergisi, 15(4), 310-318.

63. Kelly JP ve Peeper TF. (2003). Wheat (*Triticum aestivum*) and Rotational Crop Response to MON 37500, Weed Technology, 17(1), 55-59.
64. Kurtar ES. (1999). Kabakta (*Cucurbita pepo* L.) Haploid Embriyo Uyarımı ve Bitki Oluşturma Üzerinde Araştırmalar. Ç. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Adana, 203 s.
65. Lantos C, Juhász AG, Somogyi G, Ötvös K, Vági P, Mihály R, Kristóf Z, Somogyi N ve Pauk J. (2009). Improvement of isolated microspore culture of pepper (*Capsicum annuum* L.) via co-culture with ovary tissues of pepper or wheat. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 97:285- 293
66. Malidza G, Jocic S ve Skoric D. (2000). Imidazolinone-resistant sunflower (*Helianthus annuus* L.) inheritance of resistance and response towards selected sulfonylurea herbicides. Proc. of The 15th Int. Sunflower Conf., June 12-15, Toulouse, France, 42-47.
67. Marinkovic R. (1992). Path-coefficient analysis of some yield components of sunflower (*H. annuus* L.). I. Euphytica, 60 (3):201-205.
68. Martinez JM, Vich B, Velasco L, Dominguez J ve Melero J.M. (2005). Disease Resistance and Orobanche Resistance FAO Consultation Meeting NoviSad. July 17–20, Serbia and Montenegro, 26.
69. Melchinger AE. (1990). Use of Molecular Markers in Breeding for Oligogenic Disease Resistance. Plant Breeding 104:1-19. 2.
70. Michaelson MJ, Price HJ, Johnston JS ve Ellison JR. (1991). Variation of nuclear DNA content in *Helianthus annuus* (Asteraceae). Amer. J. Bot., 78,1238–1243.
71. Miller JF ve Al-Khatib K. (2000). Development of Herbicide Resistant Germplasm in Sunflower. In Proc. of The 15th Int. Sunflower Conf., June 12-15, Toulouse, France, 37-41.
72. Miller JF ve Fick GN. (1997). The genetics of sunflower. In: Schneiter AA (ed) Sunflower production and technology. Agronomy Monograph 35. ASA-CSSA-SSSA, Madison, pp 441–495.
73. Miller JF. (1992). Update on inheritance of sunflower characteristics. In: Proc. 13th Int. Sunflower Conf., Sept. 7-11, Pisa, Italy, Vol. II, pp. 905-945.
74. Miller JF ve Al Khatib K. (2004). Registration of two oilseed sunflower genetic stocks, SURES-1 and SURES-2, resistant to tribenuron herbicide. Crop Sci.

44:1037- 1038.

- 75.Mohammadi PP, Moieni A, Ebrahimi A ve Javidpar F. (2011). Doubled Haploid Plants Following Colchicine Treatment of Microspore- Derived Embryos of Oilseed Rape (*Brassica napus* L.). Plant Cell Tissue Organ Culture.
- 76.Munsuz N, Çaycı G ve Sözüdoğru S. (2001). Toprak Islahı ve Düzenleyiciler (Tuzlu ve Alkali Toprakların Islahı) Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, No:1518, Ankara.
- 77.Murashige T. ve Skoog FA. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15, 473-497.
- 78.Narayana E ve Patel JC (1998) Correlation studies in sunflower. Gujarati Agricultural University Research Journal, 23 (2):100-102.
- 79.Ohri D. (1998). Genome Size Variation and Plant Systematics. Ann. Bot., 82 (Suppl. A.), 750-812.
- 80.Özcan S. ve Özgen M. (1996). Bitki genetik mühendisliği. Kükem dergisi, 1; 69-95.
- 81.Özhatay N, Koçyiğit M ve Akalın-Uruşak E. (2012). One more *Allium* species for the Turkish flora: *Allium saxatile*. Turkish Journal of Botany 36:644-649.
- 82.Özyiğit İİ. (1998). Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.)'nde doku kültürü sistemlerinin kurulması. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Marmara Üniversitesi
- 83.Pacureanu-Joita M, Vranceanu AV, Soare G, Marinescu A ve Sandu I. (1998). The evaluation of the parasite- host interactionthe system (*Helianthus annuus* L.) - *Orobancha cumana* Wallr.) in Romania. Proceedings of 2nd Balkan Symposium on Field Crops. 16-20 June, Novi Sad, Yugoslavia, 153-155.
- 84.Price HJ ve Bachmann K. (1975). DNA Content and Evolution in the *Microseridinae*. Am. J. Bot., 62: 262-267.
- 85.Pugliesi C, Megale P, Cecconi F ve Baroncelli S. (1993). Organogenesis and embryogenesis in *Helianthus tuberosus* and in the interspecific hybrid *Helianthus annuus* × *Helianthus tuberosus*". Plant Cell Tiss. Org. Cult., 33, 187–193
- 86.Punia MS ve Gill HS. (1994). Correlations and path coefficient analysis for seed yield traits in sunflower (*H. annuus* L.). Helia, 17 (20):7-11.

87. Rees H. ve Walters MR. (1965). Nuclear DNA and the Evolution of Wheat. *Heredity*, 20, 73-82.
88. Saji KV ve Sujatha M. (1998). Embryogenesis and plant regeneration in anther culture of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Euphytica* 103: 1-7
89. Sala C.A., Bulos M., Echarte M., Whitt S.R., Ascenzi R. (2008): Molecular and biochemical characterization of an induced mutation conferring imidazolinone resistance in sunflower. *Theoretical and Applied Genetics*, 118: 105–112.
90. Sala C.A., Bulos M., Altieri E., Weston B. (2012): Response to imazapyr and dominance relationships of two imidazolinonetolerant alleles at the Ahas1 locus of sunflower. *Theoretical and Applied Genetics*, 124: 385–396.
91. Sarı N ve Abak K. (1995). Farklı ışın dozlarının ve ışınlamaya alternatif uygulamaların karpuzda haploid embriyo uyartımına etkileri. Türkiye II. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, Cilt II, 212-215.
92. Sarı N, Abak K, Pitrat M, Rode JC ve Dumas de Vaulx R. (1992b). Karpuzda (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf.) ışınlanmış polenle haploid bitki elde edilmesi: Işınlanmış polenlerde çimlenme yeteneğinin değişimi, KÜKEM Dergisi, 15, 2: 15-21.
93. Sari N, Abak K, Pitrat M, Rode JC ve Dumas De Vaulx, R. (1994). Induction of parthenogenetic haploid embryos after pollination by irradiated pollen in watermelon. *HortScience*, 29 (10), 1189-1190.
94. Sarıkamış, G., Ellialtıoğlu, Ş. ve Yanmaz, R. (2000) Lahanada çiçek tomurcuğu morfolojisi ile mikrospor gelişme dönemi arasındaki ilişkinin belirlenmesi. 3. Sebze Tarımı Sempozyumu Bildirileri, Isparta, 72-76.
95. Sims LE ve Price HJ. (1985). Nuclear DNA content variation in *Helianthus* (Asteraceae). *Amer. J. Bot.*, 72, 1213–1219.
96. Singh RJ. (2002). *Plant Cytogenetics*. CRC Press, USA.
97. Sukno S, Melero-Vara JM ve Ferná'ndez-Martí'nez JM. (1999). Inheritance of resistance to *Orobanche cernua* Loefl. in six sunflower lines. *Crop Sci.*, 39, 674-678.
98. Tan S, Evans RR, Dahmer ML, Singh BK ve Shaner DL. (2005): Imidazolinone-tolerant crops: History, current status and future. *Pest Management Science*, 61: 246–257.

- 99.Thengane SR, Joshi MS, Khuspe SS ve Mascarenhas AF. (1994). Anther culture in *Helianthus annuus* L., influence of genotype and culture conditions on embryo induction and plant regeneration. Plant Cell Rep. 13: 222-226.
- 100.Thomas, WTB, Forster BP, Gertsson, B. (2003). Doubled haploids in breeding, Doubled haploid production in crop plants: a manual. eds: Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP. 337–349.
- 101.Todorova, M., Dahlhoff, M., Friedt, W. (1993) Microspore culture in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Biotechnol. Biotechnol. Eq. 7: 83–90.
- 102.Todorova M, Ivanov P, Shindrova P, Christov M and Ivanova I. (1997). Doubled haploid production of sunflower (*Helianthus annuus* L.) through irradiated pollen-induced parthenogenesis. Euphytica, 97, 249-254.
- 103.Torun H. (2011). Yüksek Doz Herbisit Uygulamalarının Hedef Dışı Bitkilerdeki Oluşturduğu Zararlanmalar”, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çukurova Üniversitesi.
104. Tuna, M., Vogel, K.P., Arumuganathan, K., Gill, K.S. 2001. “DNA Content and Ploidy Determination of Bromegrass Germplasm Accessions by Flow Cytometry”, Crop Sci., 41: 1629-1634.
- 105.Ünal M, Ünsal NP ve İsmailoğlu I. (2005). The Effect Of Putrescine And Difluoromethylornithine On Cell Division Activity Of Wheat In Different Ploidy Level. Caryologia 58: 15-20.
- 106.Vardar F, İsmailoğlu I ve Ünal M. (2013). Anther development and cytochemistry in *Asphodelus aestivus* (Asphodelaceae). Turkish Journal of Botany. 37:306-315.
- 107.Veilleux RE. (1994). Development of new cultivars via anther culture. Hortscience. 29(11), 1238-1241.
- 108.Vijaya Priya K, Sassikumar D, Sudhagar R ve Gopalan A. (2003). Androgenetic Response Of Sunflower In Different Culture Environments. Helia, 38, 39-50.
- 109.Vrânceanu AV, Tudor VA, Stoenescu FM ve Pirvu N. (1980). Virulence groups of *Orobanche cumana* Wallr. differential hosts and resistance sources and genes in sunflower. Proc. 9th Int. Sunfl. Conf., Torremolinos, Spain. syf. 74-80.

110. Weiss EA. (2000). Oilseed Crops. 2nd Edition, Blackwell Sci. Ltd., Victoria, Australia. 364
111. Wenzel G ve Foroughi-Wehr B. (1994). Production and Use of Isogenic Lines (Vasil IK ve Thorpe TA, editor). Plant Cell and Tissue Culture. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Hollanda, P:153-172.