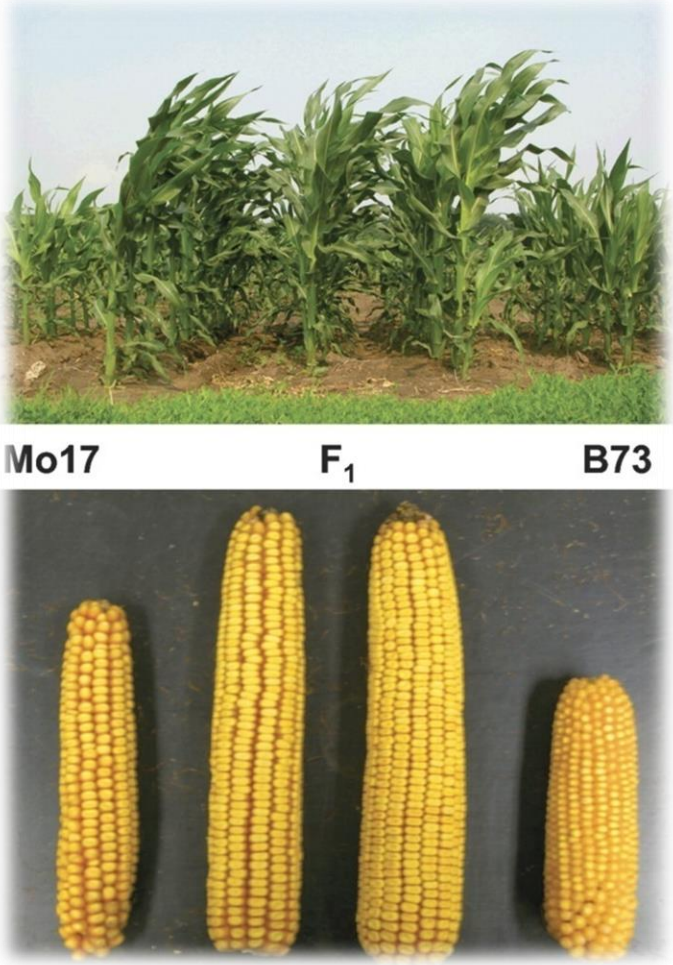
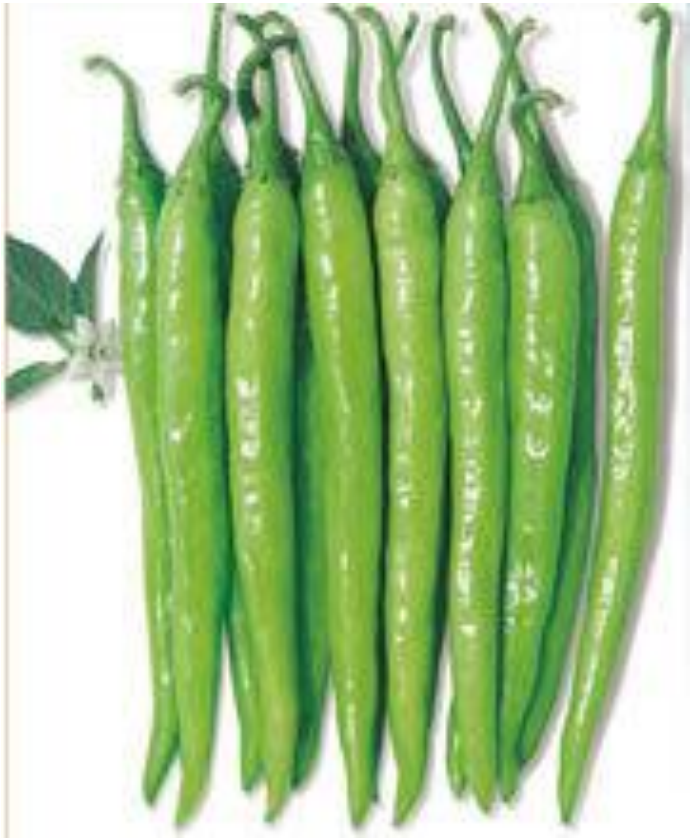
Bahçe Bitkileri Islahı
F_1 Islahı



Prof. Dr. Halit YETİŞİR

F_1 Hibrit Çeşit Islahı

İki veya daha fazla homojen bireyin (kendilenmiş hat, klon, çeşit, populasyon veya melez) melezlenmesinden elde edilen tohumlukların üretildiği çeşitlere **F_1 hibrit çeşit**, böyle çeşitlerin geliştirilmesine yönelik ıslah çalışmalarına da **F_1 hibrit çeşit ıslahı** denir.



Solda hibrit domates salkımı, sağda ise lezzeti ve kokusu daha üstün olmasına karşılık şekil ve diğer kalite özellikleri bakımından geri planda kalan yöresel bir domates

HETEROZİS:

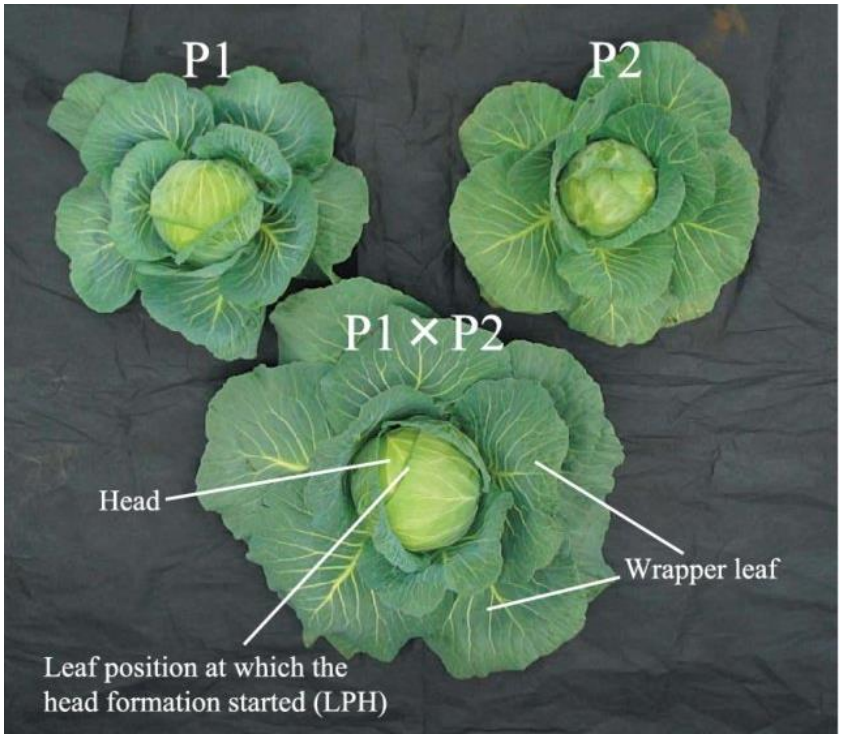
İki saf hattın (bireyin) melezlenmesinden F_1'de ortaya çıkan güç artışına **heterozis** denir.

Heterozis pozitif veya negatif olabilir. Yani F_1 ebeveynlerden güçlü ya da güçsüz olabilir.

Ancak pozitif heterozise **hibrit gücü** denilmektedir.

HETEROBELİOZİS:

F_1'lerin ebevenylerin en üstününden farkına **heterobeltiozis** denir.



M82 | *sft-4537* × M82 | *sft-4537*

B | A x B | A

Heterozisin Ölçülmesi

Ana Ebeveyn heterozisi (%) = [(F1-Ana hat)/Ana hat] x 100

Baba Ebeveyn heterozisi (%) = [(F1-Baba hat)/Baba hat] x 100

Ebeveyn ortalama heterozisi (%) = [(F1-EO)/EO] x 100

Yüksek ebeveyn heterozisi (heterobeltiozis) (%) = [(F1-YE)/YE] x 100

F1: Melez verimi; EO: Ebeveynlerin ortalaması; YE: Yüksek verimli ebeveyn

Heterozisin önemliliğinde ön varyans analiz tablosundaki hata kareler ortalamasından standart hata hesaplanabilir.

$Sx = \sqrt{(2HKO)/r}$ Sx : standart hata; HKO: hata karele ortalaması; r: Tekerrür sayısı

Ör: Bir F_1 erkenci karpuz ıslah programında P_1 (1. ebeveyn) in verim değeri 6 ton/da, P_2 (2. ebeveyn) verim değeri 8 ton/da ve F_1 melez bireyin verim değeri 10 ton/da'dır. Heterozis oranlarını hesaplayınız.

Ana Ebeveyn heterozisi (%) = [(10-6)/6] x 100 ⇒ 66

Baba Ebeveyn heterozisi (%) = [(10-8)/8] x 100 ⇒ 25

Ebeveyn ortalama heterozisi (%) = [10-(8+6/2)/7] x 100 ⇒ 43

Yüksek ebeveyn heterozisi (heterobeltiozis) (%) = [(10- 8)/8] x 100⇒ 25

F1 Hibrit Çeşitlerin Sebze Türlerinde Kullanım Durumları

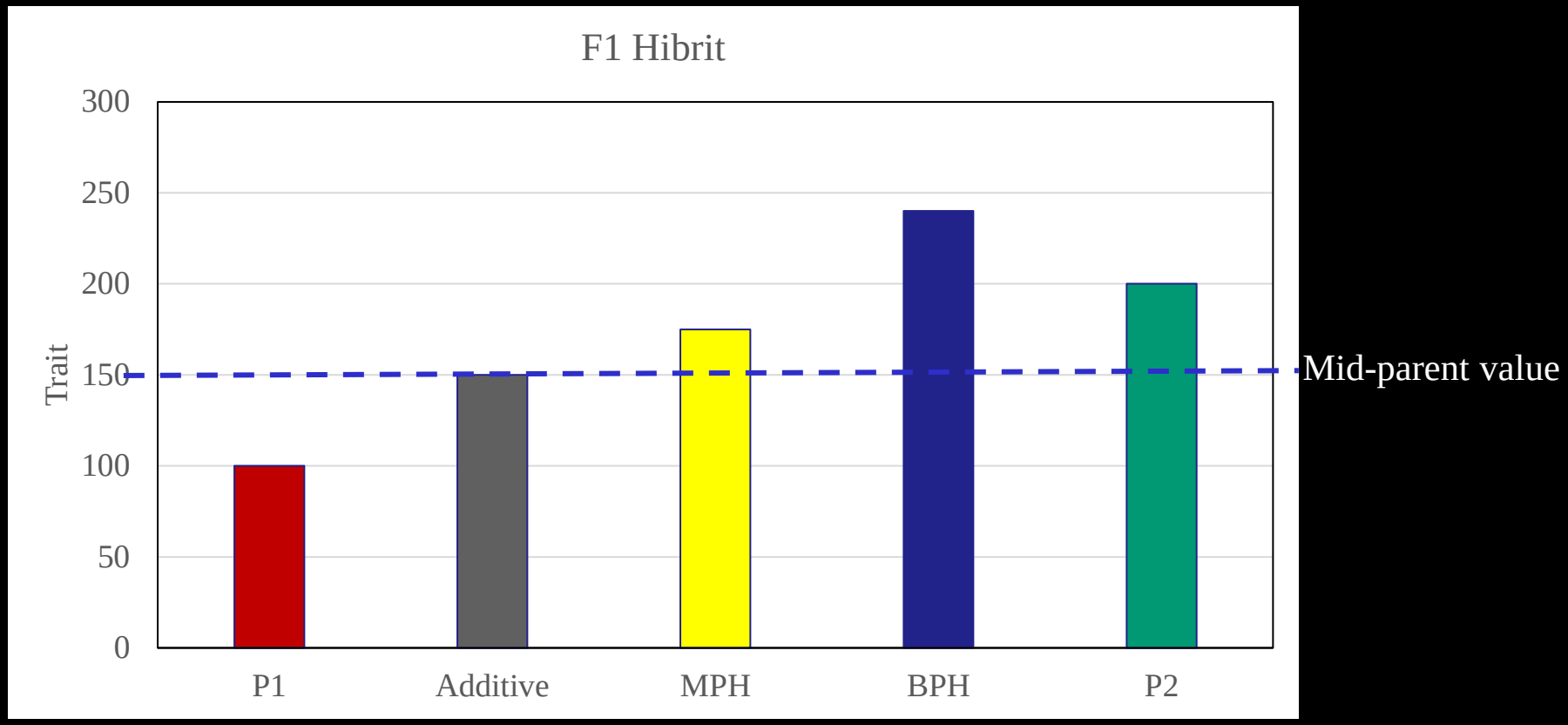
Yazlık Sebzeler	Kışlık Sebzeler
Domates**	**Soğan****
Biber**	**Havuç*****
Patlıcan**	**Ispanak****
Hıyar****	**Karnabahar****
Kabak***	**Brüksel lahanası*****
Karpuz**	**Lahana****
Kavun**	**Brokoli****
Tatlı mısır****	**Kuşkonmaz*****
	Kereviz*
	Kırmızı pancar*
* Kullanım yoğunluğunu gösterir	**Turp****

F_1 Hibritlerin Daha Güçlü Olma Nedenleri

- Dominansi hipotezi
- Süperdominansi ve heterozigoti hipotezi
- Epistatik etki hipotezi
- Çekirdek/sitoplazma ilişkisi hipotezi

Mo17 F_1 B73

Melezin davranışı ve heterozisin genetik altyapısı



Dominansi Hipotezi

Bu teoriye göre F1 hibritlerinde güç, verim ve kalite artışı genotipte dominant genlerin toplanmasından meydana gelmektedir.

A: AAbbCCddEE B: aaBBccDDEE ==== AaBbCcDdEE

Ör:

Bezelyelerde L ve l allel genleri boğum arası uzunluğu, T ve t allel genleri boğum sayısını tanımlamaktadır.

LLtt = Uzun boğum araları, az boğum sayısı

llTT= Kısa boğum araları, boğum sayısı fazla

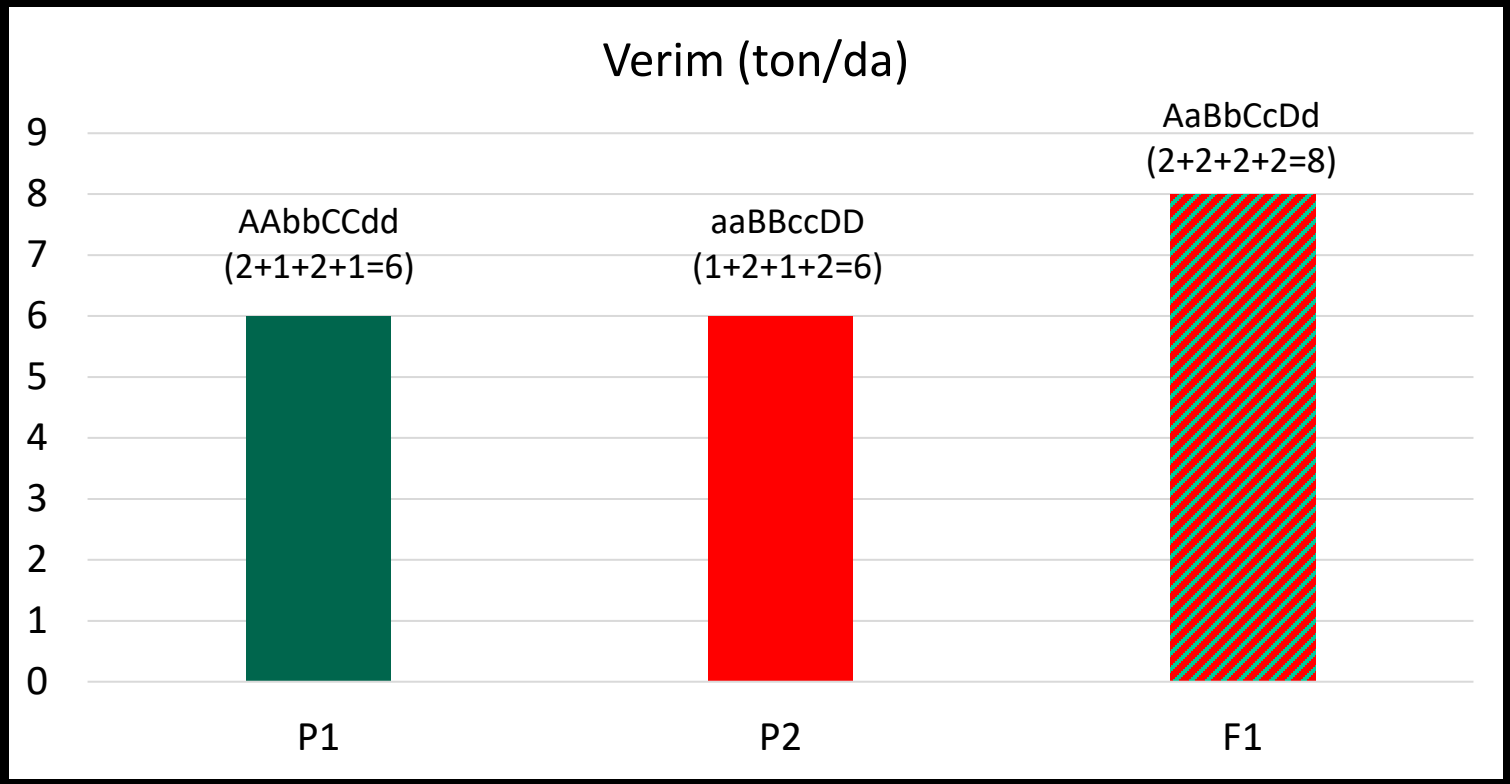
LLtt x llTT

↓

LlTt

Boğum sayısı fazla ve uzun boğum aralı bitkiler daha güçlü bitkiler

Dominansi Hipotezi



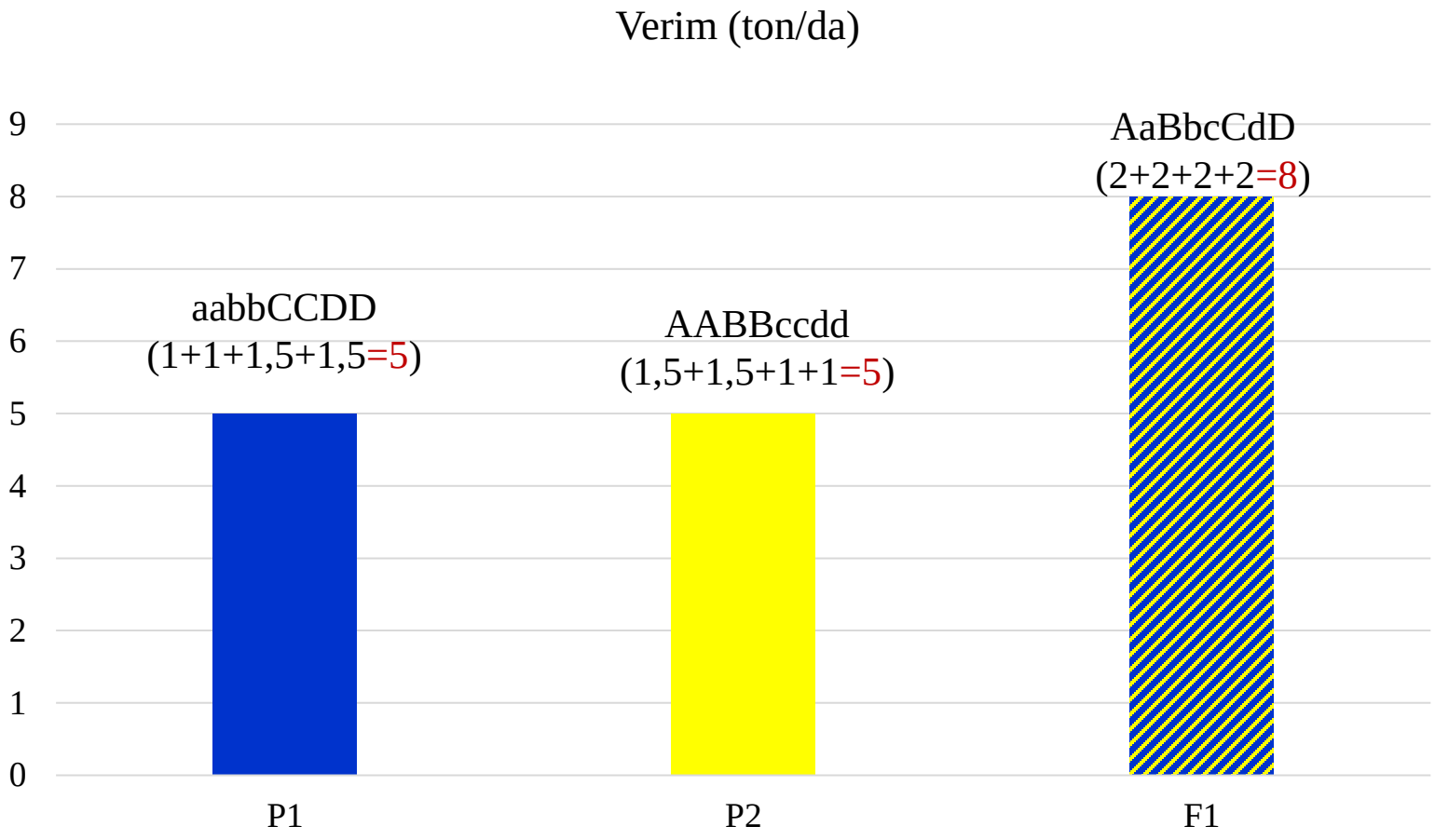
Süper Dominansi ve Heterozigoti Hipotezi

- Süper dominansi veya heterozigoti hipotezine göre; dominant genlerin heterozigot yapıda taşıyan bireyler, aynı genleri homozigot yapıda taşıyanlardan daha güçlü ve verimli olmaktadırlar.
- East ve Hayes tarafından ileri sürülen görüşe göre verim genleri heterozigot halde homozigot halden daha etkilidirler (allel içi etkileşim).

	A	**a**
A	AA	Aa
a	aA	aa

Yüksek verimli bireyler

Süper (üstün) Dominansi ve Heterozigoti Hipotezi



Epistatik Etki Hipotezi

Epistasi bir dizi gen aktivitesini (tamamlayıcı genler, eklemeli etkisi ve dominant genler arasındaki etkileşimler vb) içine alır.

Bu görüşe göre, farklı lokuslardaki genlerin, diğer genler üzerine yaptıkları etkiler de heterozise sebep olmaktadır.

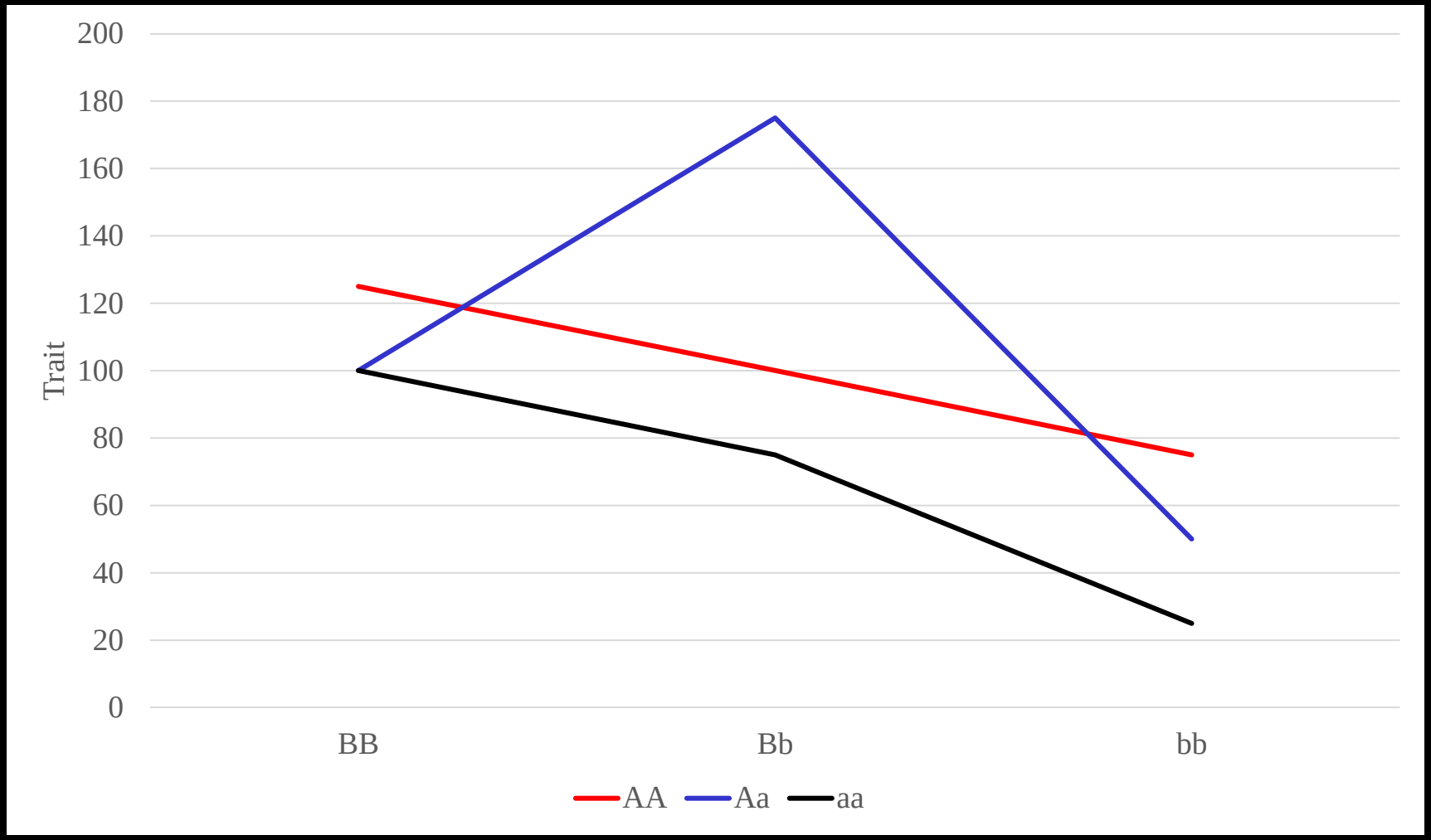
Çekirdek /Sitoplazma İlişkisi Hipotezi

Bazı araştırıcılar heterozisin, melezleme sonucunda ortaya çıkan **sitoplazması** ile bu sitoplazmaya yabancı olan bir bölüm **kromozomal yapı** arasındaki **uyuşmazlıktan/etkileşim** kaynaklandığını savunmaktadırlar.

Uzun süre kendilenmiş olan hatlarda sitoplazma ve kromozomlar birbirine adapte olmuş ve fizyolojik aktivite düşüktür.

Melezleme sonucunda hücreye katılan yabancı çekirdeksel faktör ile sitoplazma arasındaki yabancılıktan dolayı özellikle başlangıçta biyokimyasal faaliyetler yüksek olmaktadır ve verim (perormans) yükselmektedir.

Epistatik Etki Hipotezi



F_1 HİBRİT ÇEŞİTLERİN ÜSTÜNLÜKLERİ

I.Teknik açıdan

a. Heterosis olgusundan dolayı ortaya çıkan özellikler

Verim, kalite, birörneklik, vegetasyon süresinin uzunluğu, hastalık zararlılara dayanıklılık ….

b. Yeni çeşit yapma sürecinin kısalması (saf hatlar oluşturulduktan sonra).

c . Yüksek adaptasyon yeteneğine sahip olması.

II. Islahçı açısından getirdiği üstünlükler.

Islahçı hakkını güvence altına alır.

Ebeveynlerini bilen kişi veya kuruluşlar tarafından üretilebilirler.

F1 Hibrit Çeşit Tipleri

- Basit melez (tekli melez) F1 çeşitler: İki farklı kendilenmiş hat veya homozigot çeşidin melezlenmesi ile elde edilir.
- Çift melez F1 çeşitler: İki farklı tek melezin yeniden kendi aralarında melezlenmesi ile oluşur.
- Üçlü melez F1 çeşitler: Bir tek melezin yeniden üçüncü bir ebeveyn ile melezlenmesi ile oluşan çeşitlerdir.

F_1 Çeşit Islahının Aşamalı

1. Başlangıç materyalinin toplanması ve tanımlanması,
2. Homojen yapıda başlangıç materyalinin hazırlanması,
3. Heterotik grupların belirlenmesi (uzak olan saf hatların melezlenmesinden daha yüksek heterozisler alınmıştır),
4. Ebeveynlerin iyileştirilmesi,
5. En iyi kombinasyon yeteneği veren hatların araştırılması (Genel ve Özel Kombinasyon Yeteneği Testleri),
6. Melez tohumluğun üretimi,
7. Karakterizasyonu (verim denemeleri vs.) ve sertifikasyonu.

HOMOJEN YAPIDAKİ BAŞLANGIÇ MATERYALİNİN HAZIRLANMASI

- Ebeveyn olarak kendilenmiş saf hatların kullanılması uygundur. Uzun yıllar kendilenerek elde edilen hatlar arasında heterozis (melez azmanlığı, hibrit gücü) daha kuvvetli meydana gelmektedir.

- Birçok türde kendileme, herhangi bir güçlükle karşılaşmadan yapılabilir. Solanaceae, Liliaceae, Cucurbitaceae, Compositae familyalarında kendileme kolaylıkla yapılabilmektedir.

Bazı türlerde ise;

- kendileme depresyonu,
- kendine uyuşmazlık
- iki evcikli çiçek yapısı nedeniyle

…. kendileme yapmak güç ve hatta olanaksızdır.

Lahanagillerde kendine uyuşmazlık olduğundan genç tomurcukların kendilenmesi yoluna gidilmeli; ıspanakta ise ebeveyn döl arası kendilemelerinin yapılması tercih edilmelidir.

Dihaploidizasyon

Homozigot saf hatların elde edilmesindeki diğer bir yol haploidi özelliğinden yararlanmadır.

Oluşum yolları

- Spontan haploid bitkilerin oluşumu
- Haploid oluşumunun uyartılması
- Kromozom eliminasyonu (bulbosum yöntemi)

Bunun en fazla kullanılanı

- ❖ Anter kültürü (androgenesis)
  - ❖ Mikrospor kültürü
- ❖ Ovule ovaryum kültürü (gynogenesis)
- ❖ Işınlanmış polenlerle tozlama ve ardından embriyo kültürü tekniklerdir.
- ❖ Uzak akrabalar arası melezlemeler

Üçüncüsü daha çok Cucurbitaceae familyasında kullanılmakta; anter kültürleri ise daha yaygın bir kullanım alanı bulmaktadır.

Haploid bitki nedir?

Somatik hücrelerinde ait olduğu bitki türünün gamet hücrelerinde bulunan kromozom sayısı kadar kromozom bulunduran bitkilere haploid bitkiler adı

verilmektedir.

Somatik hücrelerinde **2n=2x** bulunan diploid bir bitkiden elde edilecek haploid bitkinin genom hücrelerinden oluşmuş yeni bitkiler **n=x** kadar kromozom sayısına sahip olacaklardır.

Örneğin: 2n=24 olan kavun bitkisinden elde edilecek haploid bitkilerin kromozom sayısı n=12 olacaktır.

Haploid Bitkilerin Özellikleri

Haploid bitkiler, diploid bitkilerin küçültülmüş birer örneğidir. Boyları daha kısa, yaprakları dar ve küçük olup çiçekleri de küçüktür ve polen oluşturamadıkları için kısırdır.

Haploid bitkilerin elde edilmesinden sonra bunların kromozom sayılarının bazı kimyasal maddeler yardımıyla iki katına çıkartılması işlemine **dihaploidizasyon** denilmektedir. Islah programlarında kullanılan bitkiler, bu yolla elde edilmiş dihaploid (double haploid=katlanmış haploid) bitkilerdir.

Kolhisin, güz çiğdeminden ekstrakte edilen bir **alkaloittir**. Mitoz bölünme sırasında **iğ iplikçiklerinin oluşumunu engeller**. Haploidlerin kromozom sayısının katlanması ve dihaploidlerin elde edilmesinde kullanılır. **Orizalin, trifluralin, and amiprophosmethyl (APM)** gibi başka kimyasallar da vardır.

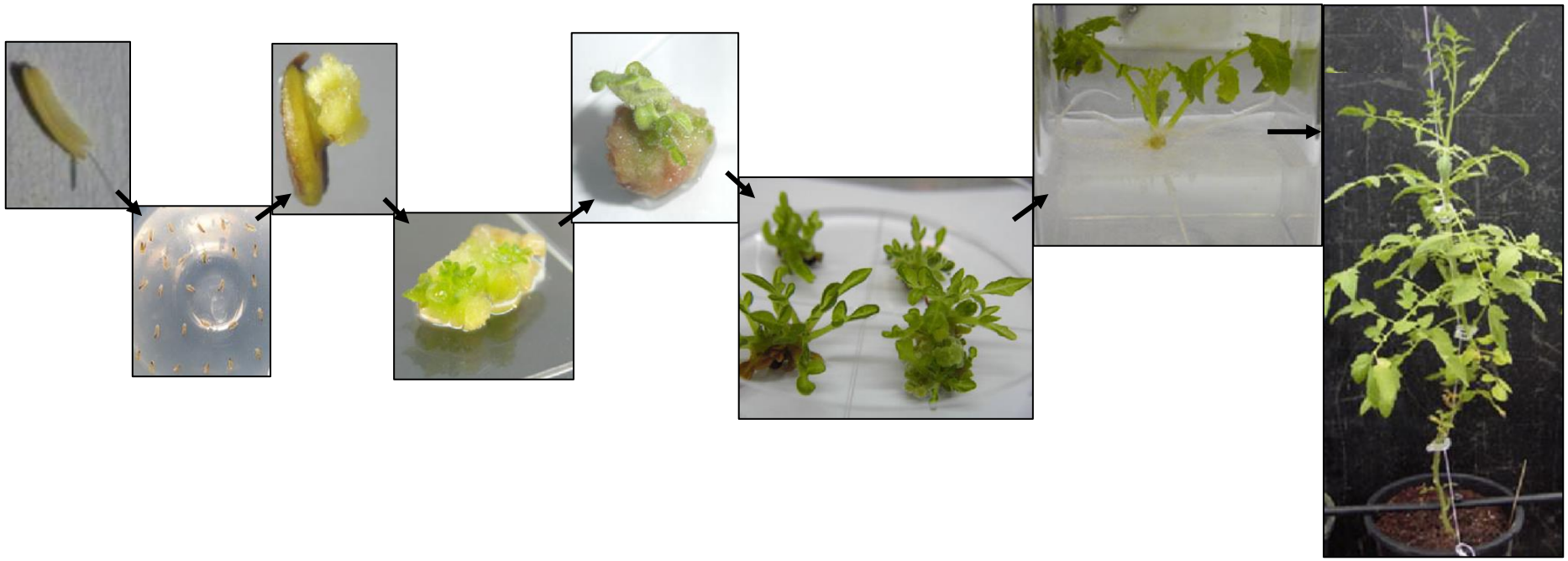
Haploid Bitki

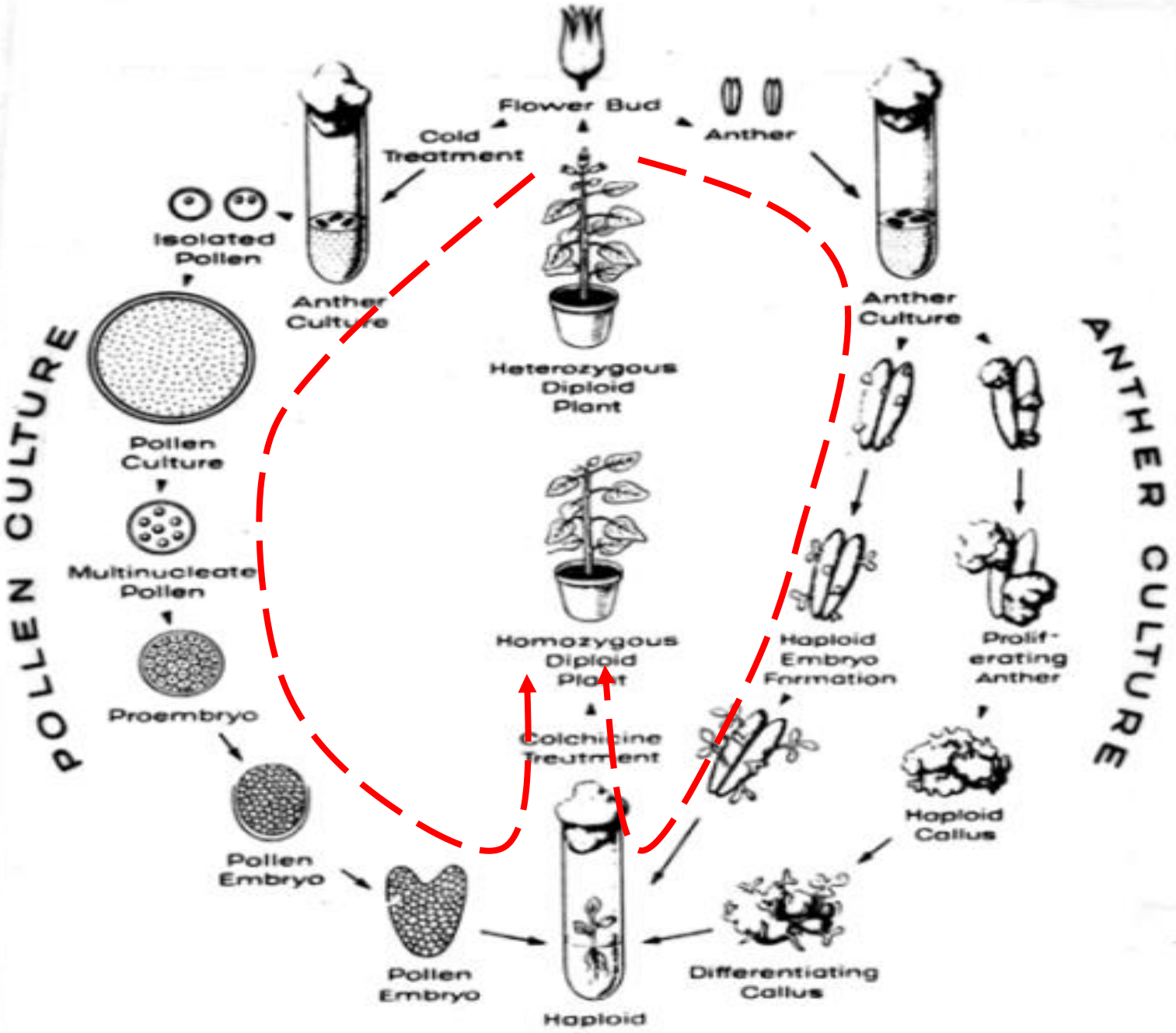
Haploid bitkilerin düzenli ve yüksek oranda elde edilebilmesi için önerilen yöntemleri genel olarak iki ana grupta toplamak mümkündür:

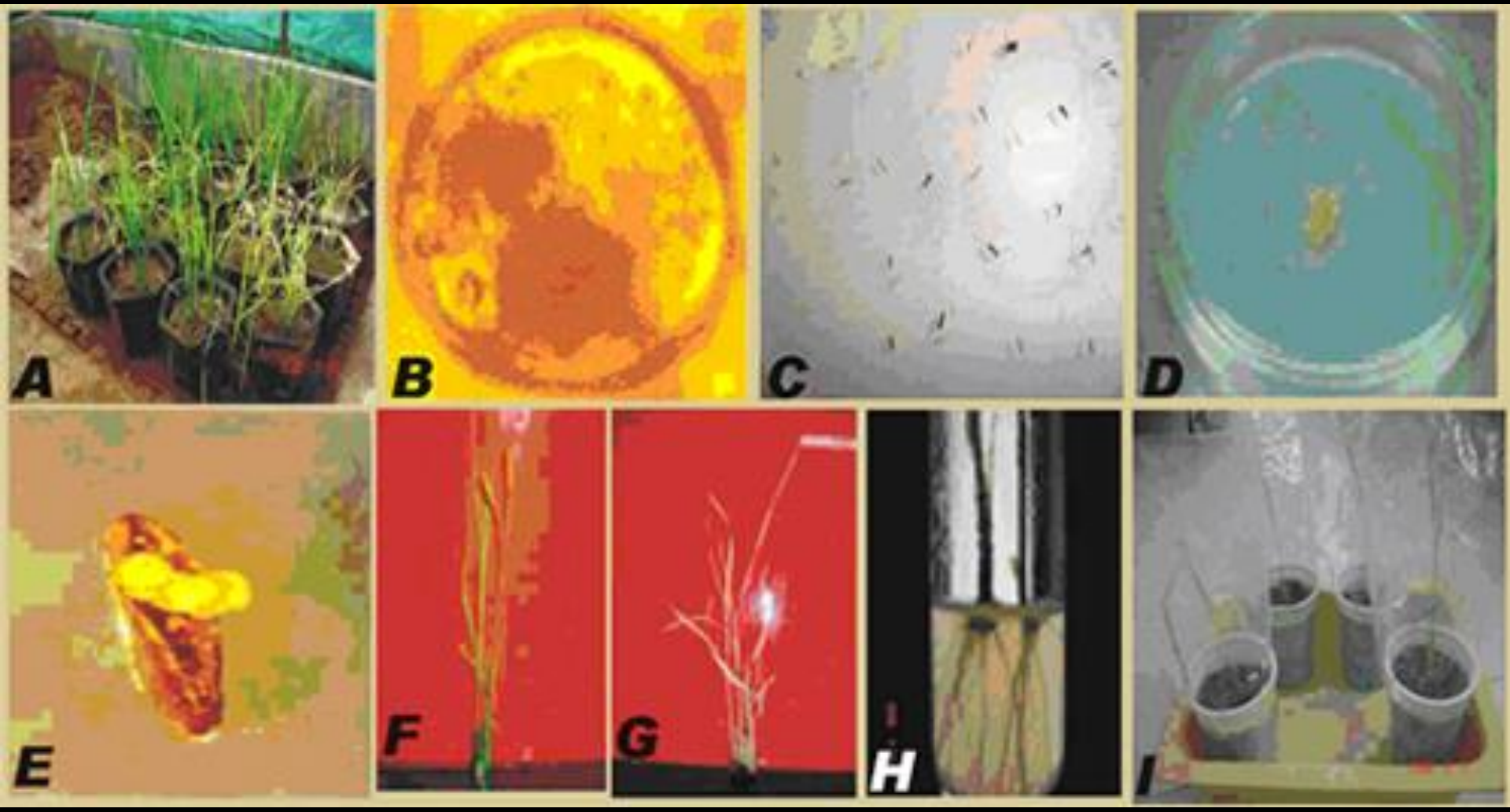
1. *In situ* haploid uyartımı
    a. Uzak akraba arası melezler
    b. Tozlamanın geciktirilmesi
    c. Abortif veya ışınlanmış polenlerle tozlama
    d. Değişik kimyasallar ve hormon uygulamaları
    e. Sıcaklık şokları
    f. X veya UV ışını uygulamaları
2. *In vitro* dişi veya erkek gamet kültürleri
    a. Ovul ovaryum kültürü
    b. Anther kültürü

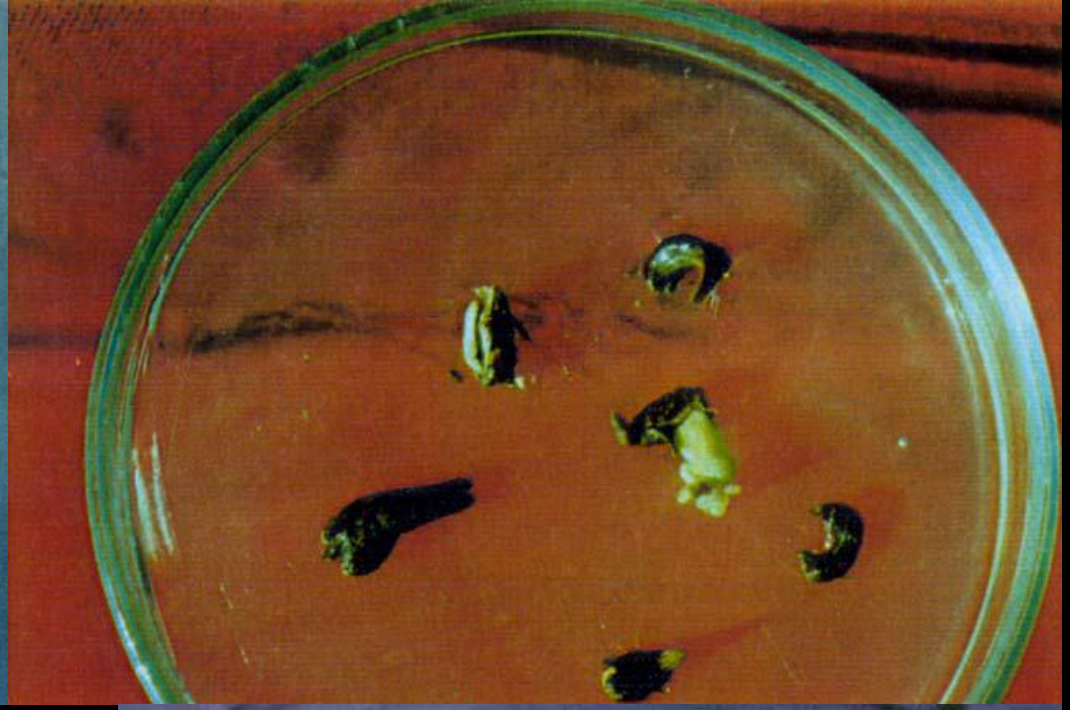
ANTER KÜLTÜRÜ

İçerisinde olgunlaşmamış çiçek tozlarını (mikrospor) bulunduran anterlerin tomurcuklardan izole edilerek *in vitro* koşullarda yapay besin ortamlarına alınması ve burada mikrosporlardan haploid embriyoların elde edilmesine **anter kültürü** adı verilmektedir.

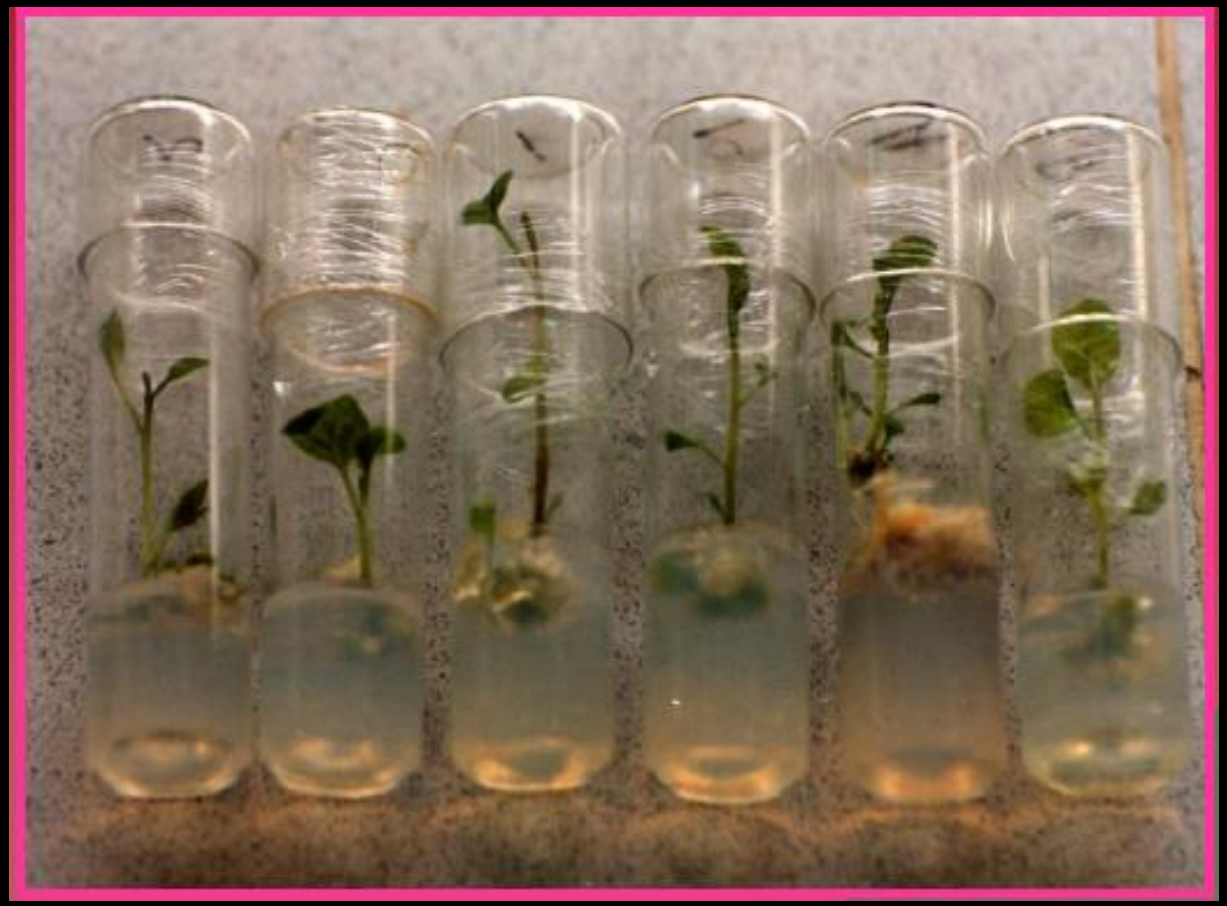


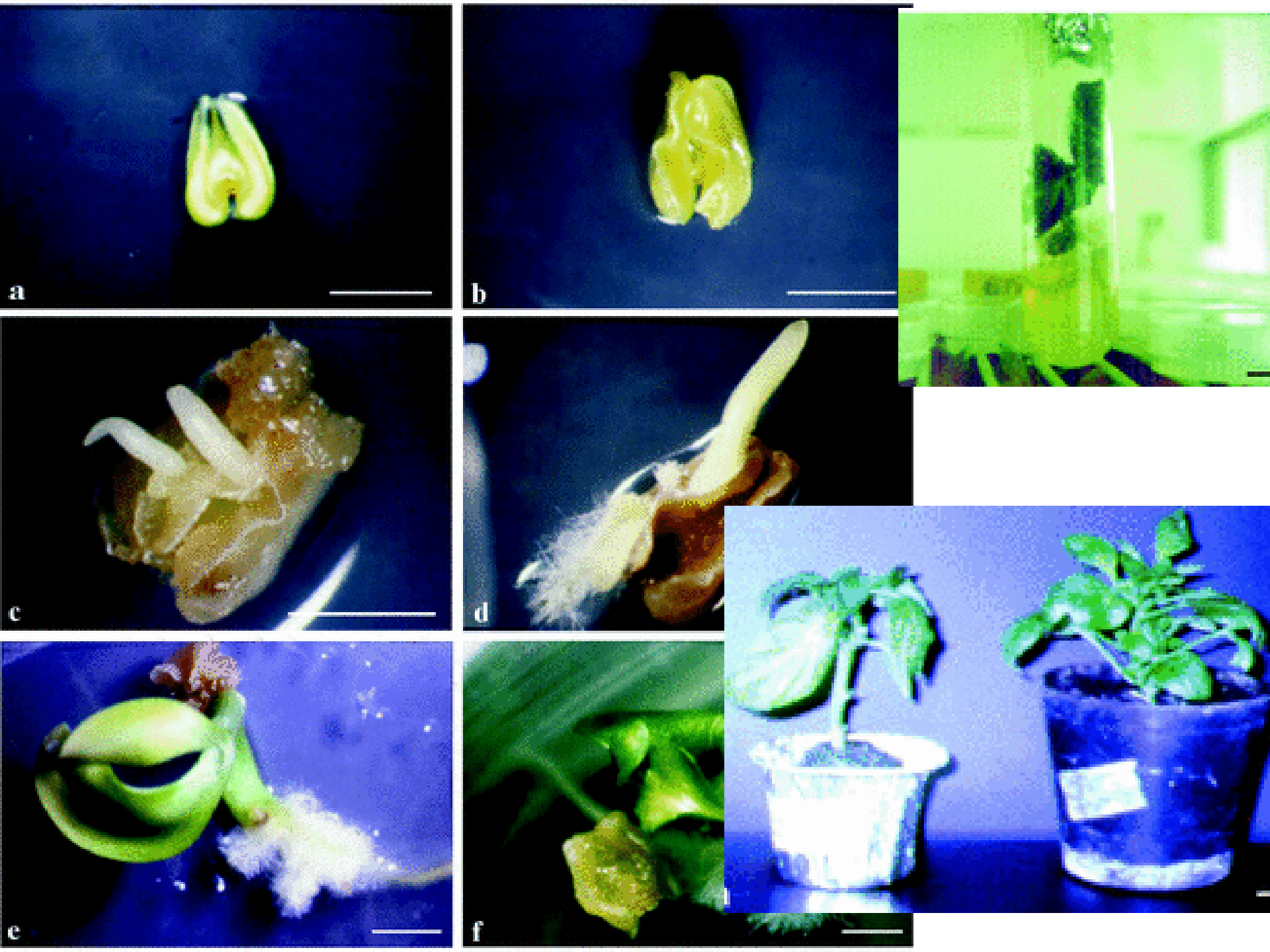

Flower Bud
Cold Treatment
Anther
Isolated Pollen
Anther Culture
Anther Culture
Heterozygous Diploid Plant
POLLEN CULTURE
ANTHER CULTURE
Pollen Culture
Multinucleate Pollen
Proembryo
Homozygous Diploid Plant
Haploid Embryo Formation
Prolif-erating Anther
Colchicine Treatment
Haploid Callus
Pollen Embryo
Pollen Embryo
Differentiating Callus
Haploid


A
B
C
D
E
F
G
H
I



Anterlerden direkt embriyo çıkışı




a
b
c
d
e
f

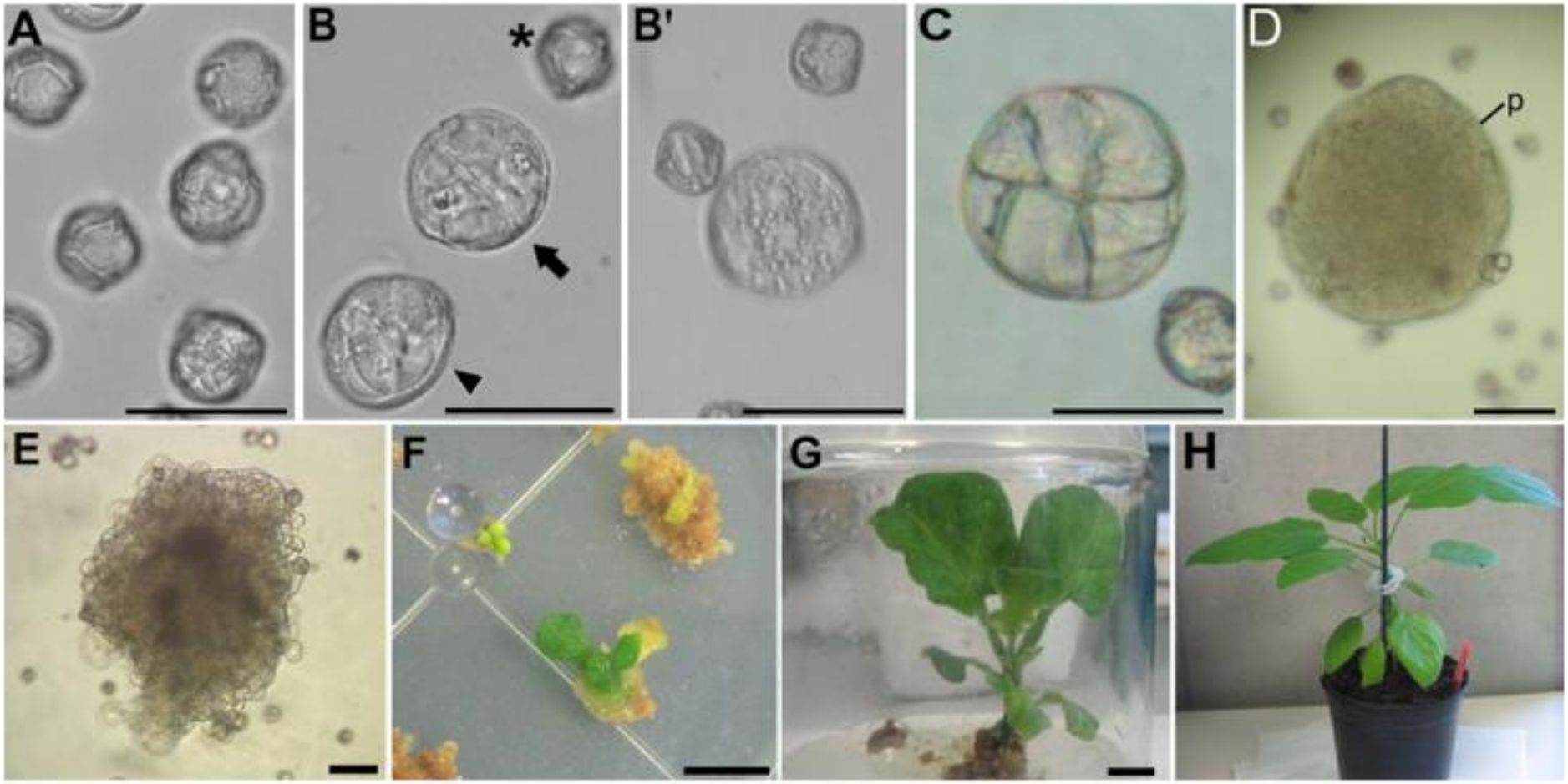
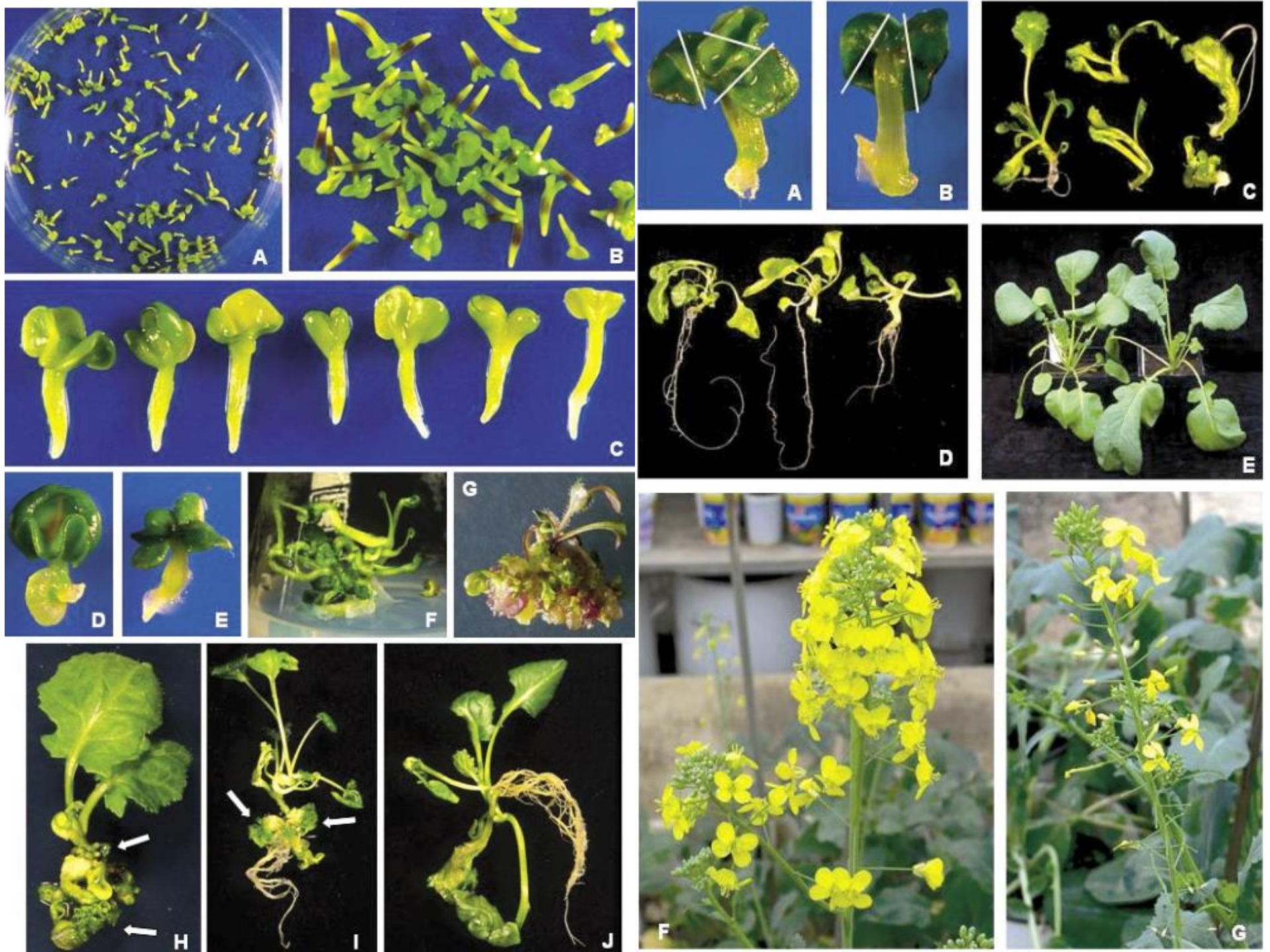
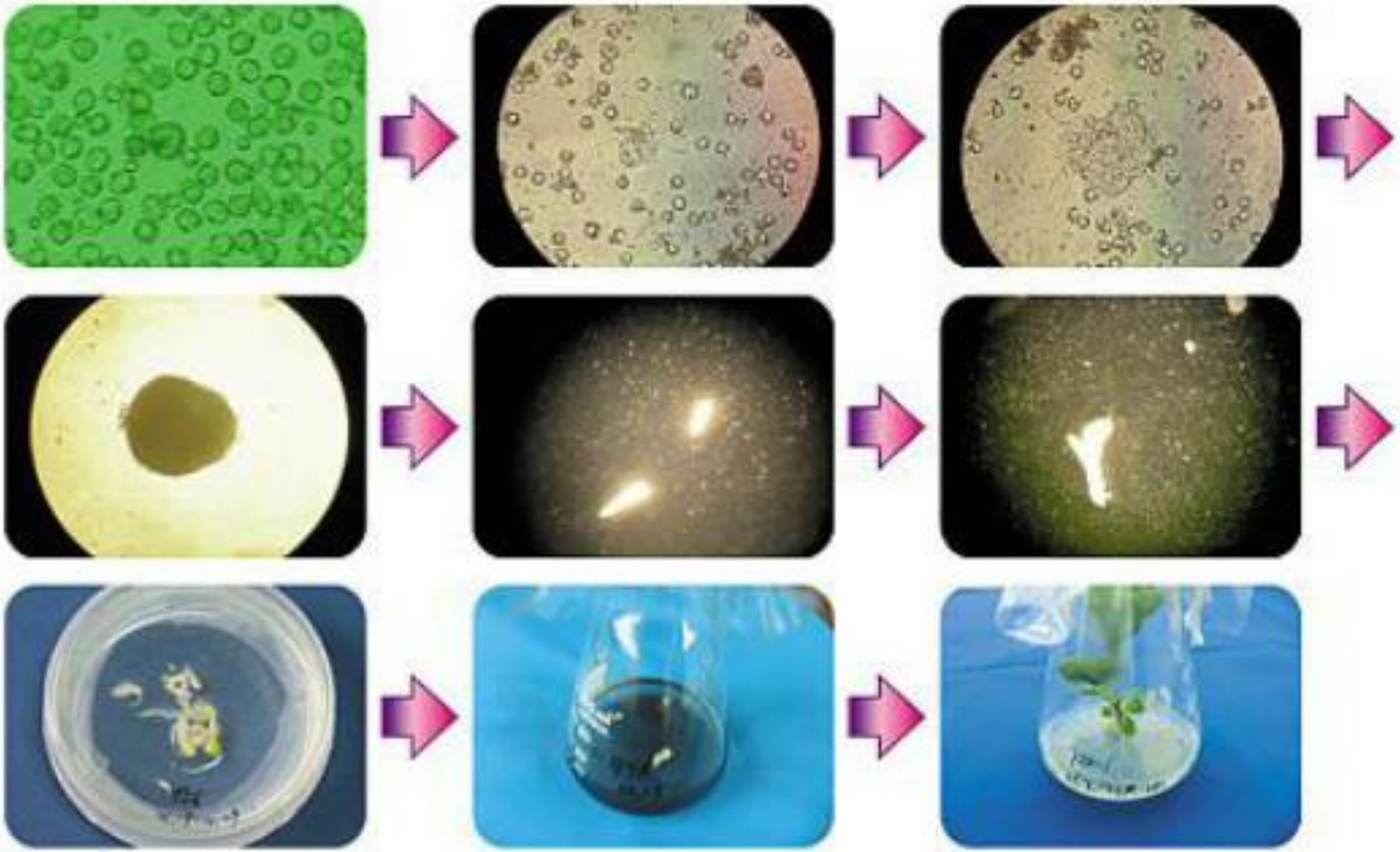


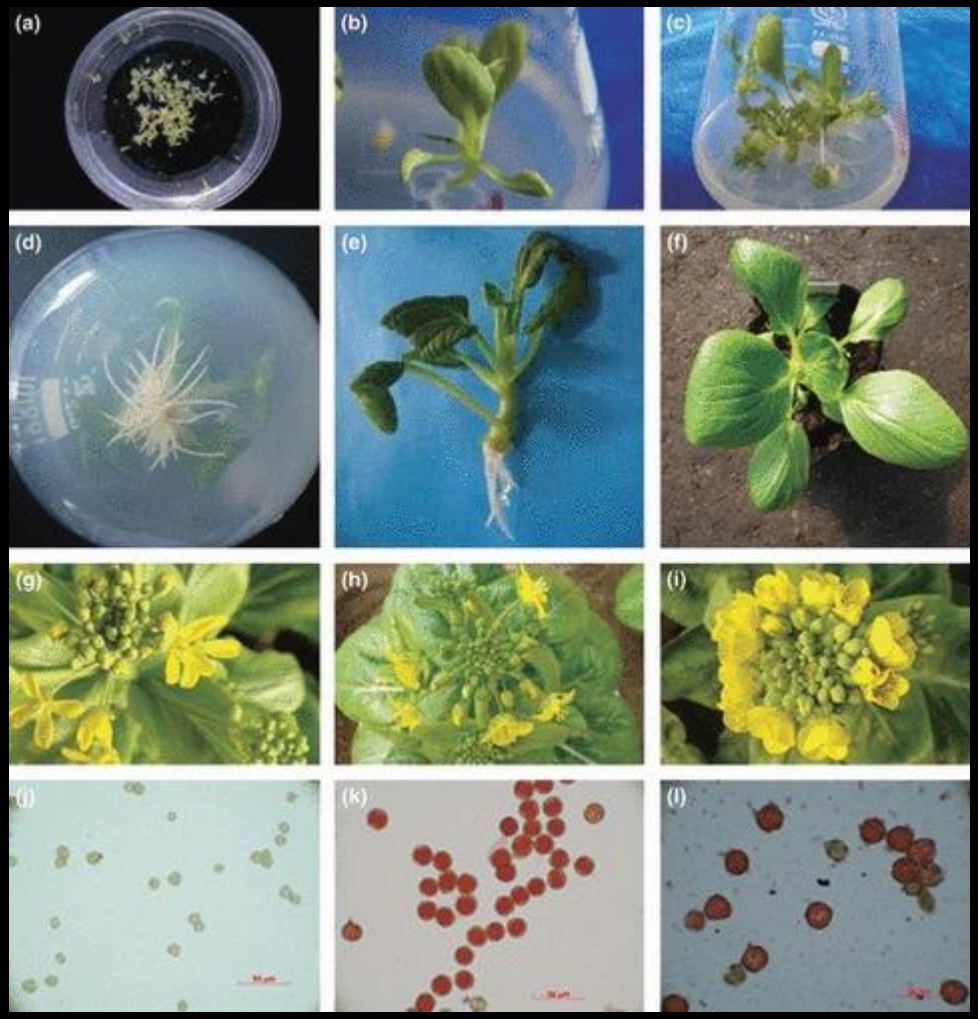
Fig. 2 Androgenic development of eggplant microspores. **a** Freshly isolated microspores. **b** Induced microspores just before (*arrowhead*) and after the first embryogenic division (*arrow*), together with arrested or dead microspores (*asterisk*). **b′** Non-induced microspores that enter a gametophytic-like developmental pathway. *Note* the presence of abundant starch granules, mostly surrounding the two sperm-like cells of the central pollen-like structure. **c** Six-celled multicellular microspore. **d** Globular embryo with the protoderm (*p*) layer. **e** Microscopic callus-like structure. **f** Macroscopic calli with organogenic shoots at their surface. **g** In vitro microspore-derived plantlet. **h** Acclimated eggplant DH plant. *Bars*: **a**–**e** 50 μm, **f**, **g**: 1 cm


A
B
C
D
E
F
G
H
I
J



茄子游离小孢子培养：通过小孢子胚途径获得再生植株。

Isolated microspore culture of eggplant: plant regeneration through microspore embryo



Brassica rapa mikrospor kültürü.

a. Mikrospor izolasyonundan 3 hafta sonra sıvı NLN-13 ortamında tam gelişmiş embriyolar.
b. Kotiledon embriyolardan gelişmiş bitki.
c. Kallustan gelişmiş bitkiler.
d. MS ortamı + 0.1 mg/l naphthalene acetic acid ortamında gelişmiş kökler.
e. Transfer edilecek bitki.
f. Toprağa aktarılmış bitki.
g. Haploid bitkilerin çiçekleri.
h. Haploid bitkilerin çiçekleri
i. Diploid bitkilerin çiçekleri
j. Haploid polenler
k. Diploid polenler
l. Diploid polenler

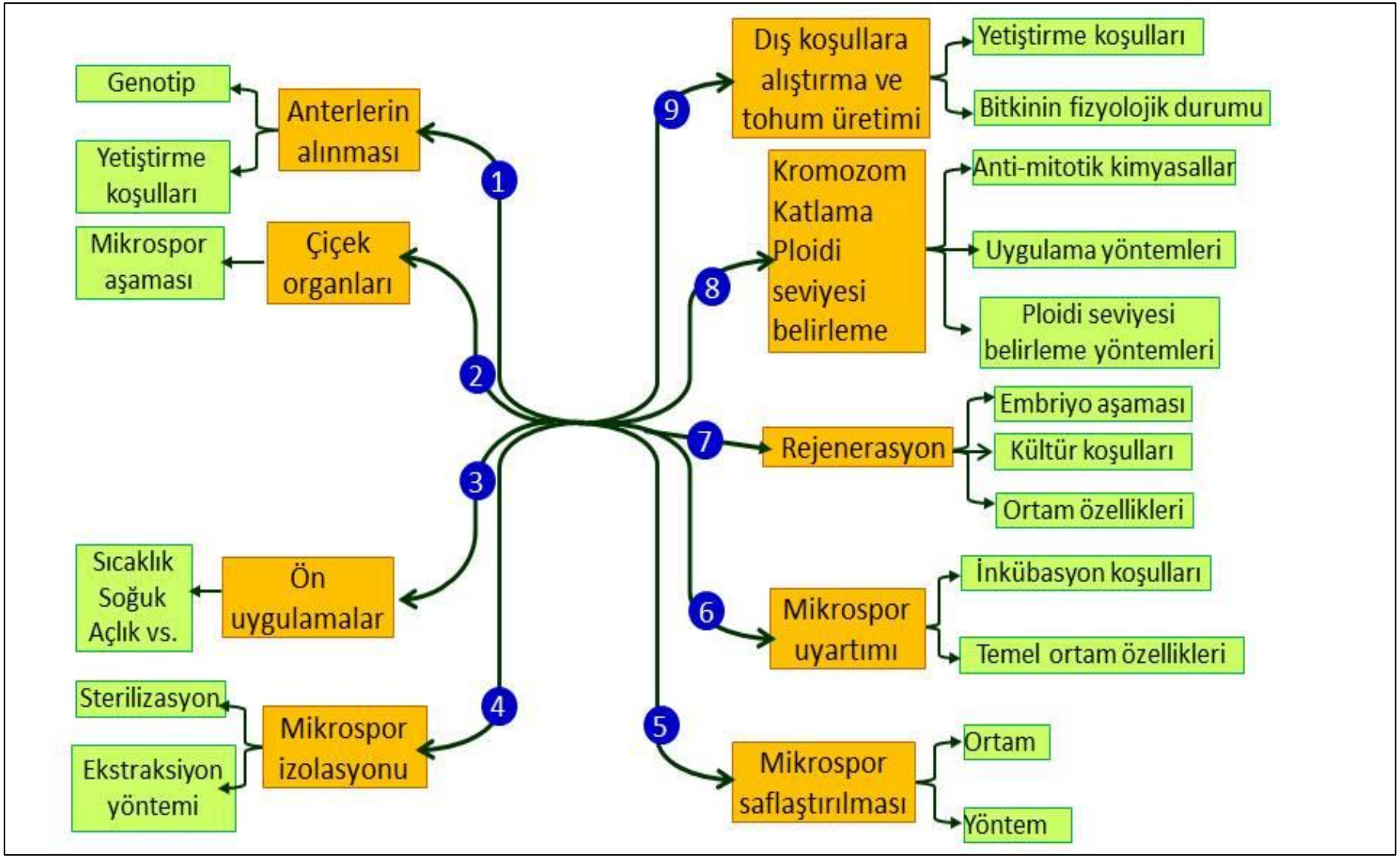
Androgenesis

Buğday, arpa, kuşkonmaz, çeltik, lahana grubu sebzeler, mısır, biber, patlıcan, petunya gibi çok sayıda türde elde edilen androgenetik haploidler, ıslah programlarında kullanılmıştır.

Bunun dışında 25 familyaya ait 200'den fazla bitki türünde anter kültürü yapılarak başarılı sonuçlar rapor edilmiştir.

Androgenesisi etkileyen faktörler

1. Donor bitkinin genotipi
2. Mikrospor veya anterin gelişme dönemi
3. Anterin hücre duvarı özellikleri
4. Ön uygulamalar (sıcak/soğuk)
5. Kültür ortamı ve yoğunluğu
6. Işık ve sıcaklık koşulları
7. Donor bitkinin fizyolojik durumu



Androgenesisin aşamaları ve başarıyı etkileyen faktörler (Asif, 2013'ten uyarlanmıştır).

ANTER KÜLTÜRÜNDE ÇIKABİLECEK SORUNLAR

- Anter ve embriyonun gelişiminde başarısızlıklar.
- Mikrospor haricinde dokulardan gelişme (diploid veya poliploid).
- Albino bitkilerin oluşması (tahıllar).
- Kullanılan büyümeyi düzenleyicilerin haploid bitkiler için ölümcül olabilmesi ve diploid veya poliploid hücrelerin gelişmesi.
- Bazen double haploidlerde görülebilen açılımlar.

GİNOGENESİS

- Ginogenesis döllenmemiş dişi gametlerin (*ovül*, *ovaryum*) kültüre alınmasıdır.
- Bu yönteme androgenetik metotlar cevap vermediğinde başvurulur. (*Albino bitkilerin oluştuğu veya donör bitkinin erkek kısır veya gynoik olduğu durumlar*).
- Ginogensis genellikle androgensise göre daha az etkilidir.
- Androgenesise cevap vermeyen bitki gruplarında kullanılır.
  - *Liliaceae*
  - *Compositae*
  - *Cucurbitaceae…*

1. Sağlıklı ebeveyn bitkilerin seçilmesi
2. Ovül ovaryum gelişim süreçlerinin kontrol edilmesi ve belirlenmesi
3. Uygun çiçek tomurcuklarının seçilmesi, soğuk koşullarda lab'a getirilmesi ve yüzey siterilizasyonu
4. Ovül ve ovaryumun uygun ortamda kültüre alınması
5. Kallus veya embriyo rejenerasyonu, bitkiye dönüşüm, çoğaltma, alıştırma ve dışarı çıkartma

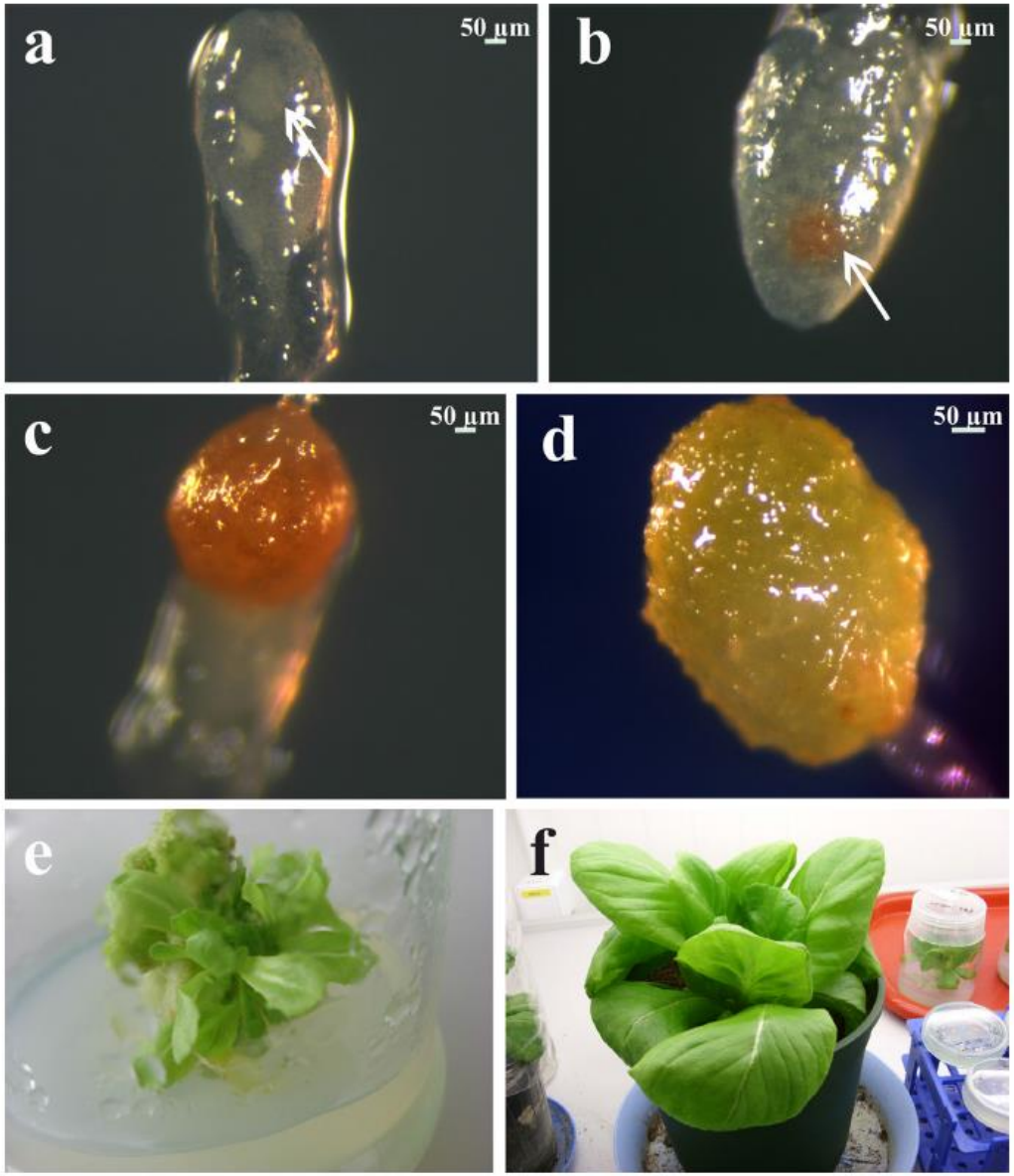
A
Onion umbels at the time of harvest
Optimal stage of flower bud development for culture 3.5–4.5 mm length
C
Flower after 7 days of culture
D
Flowers from cultivar Recas after 45 days of culture
E
Gynogenetic embryo fromation from 90 days culture
F
Isolated embryo
G
Onion embryo treated with APM in liquid medium for ch. doubling
H
Regenerated plants
I
acclimation in greenhouse
J
Bulb formation
K
Seed production

Uzak akrabalar ile melezleme yolu ile haploid uyartımı

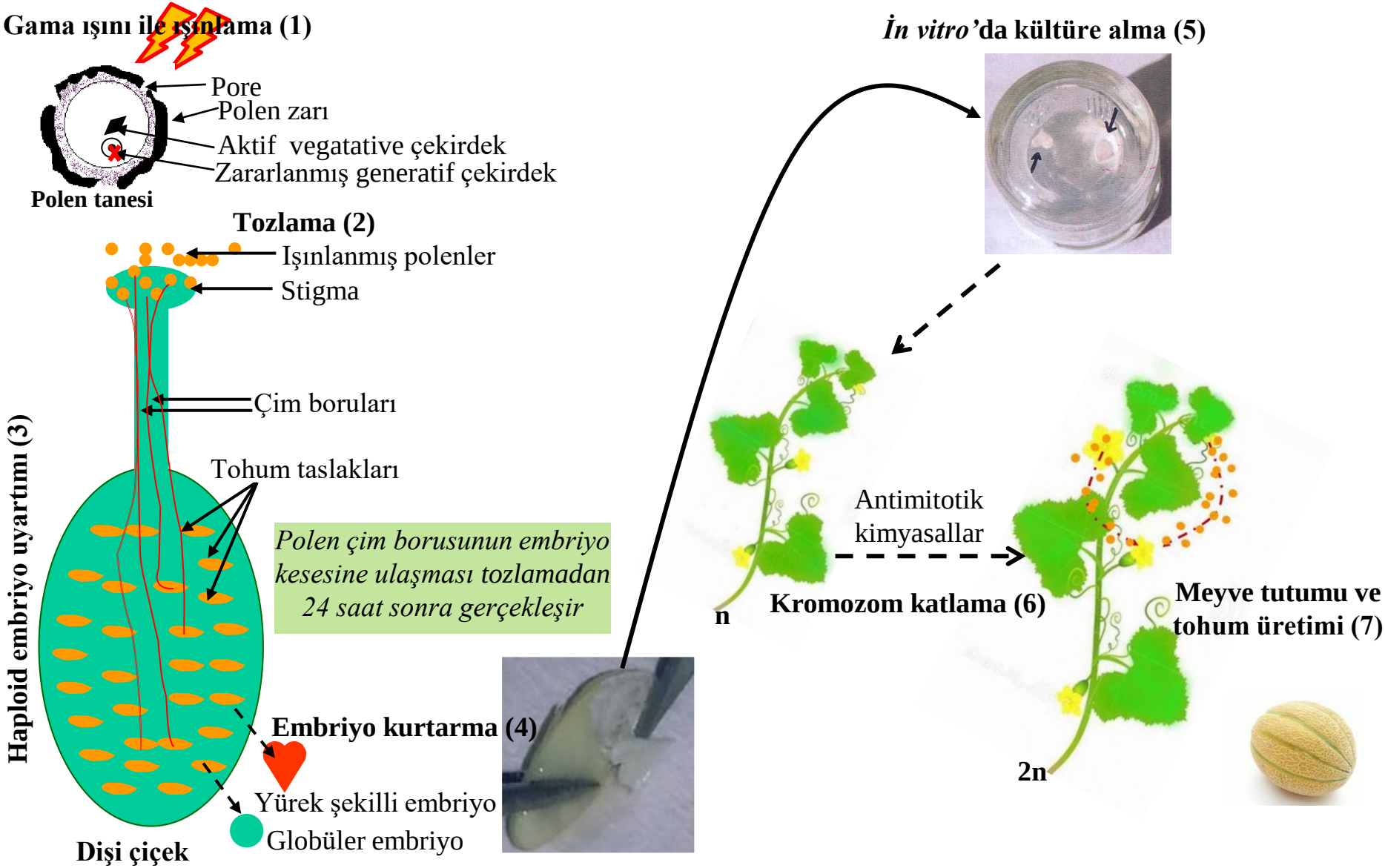
(*Lactuca sativa* x *Heliantus tuberosus*

Lactuca sativa (marul)'da haploid bitki oluşumu.

a. Haploid embriyo bulunan embriyo kesesi
b. 15 gün sonra kültür ortamında gelişen embriyo.
c. 25 gün sonra kalluslaşan embriyo.
d. Kallusun 40. günü
e. Haploid marul bitkiciği 65 gün sonra
f. Dışarıya aktarılmış haploid marul bitkisi



Piosik et al., 2016



Işınlanmış polenle kavunda haploid bitki üretimi

Dış koşullara alıştırma

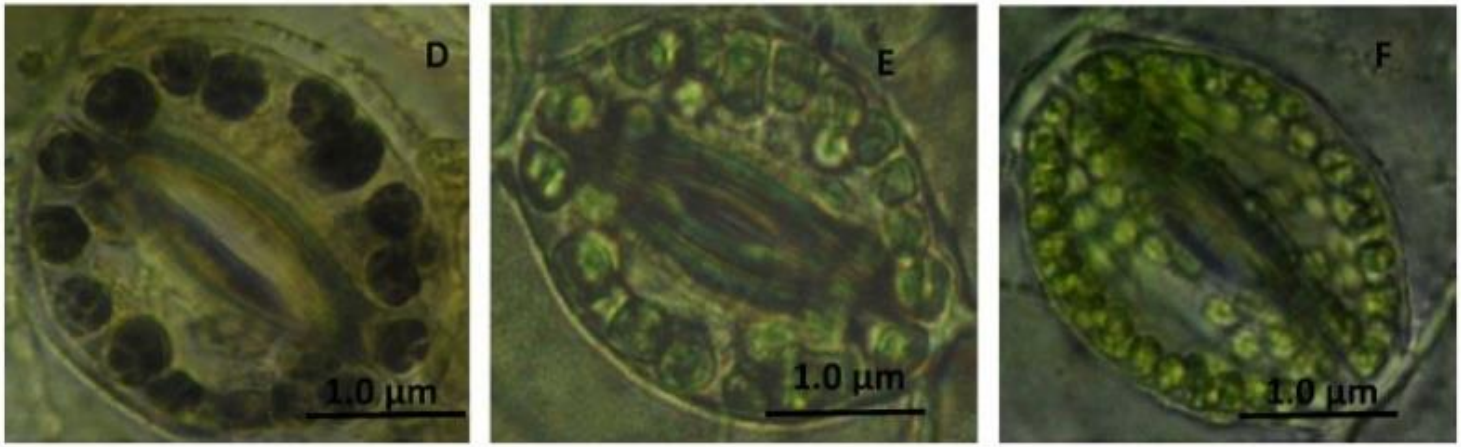
- ✓ Düşük ışık yoğunluğu
- ✓ Yüksek nem (%70-90)
- ✓ 20-25 °C sıcaklık

n
2n

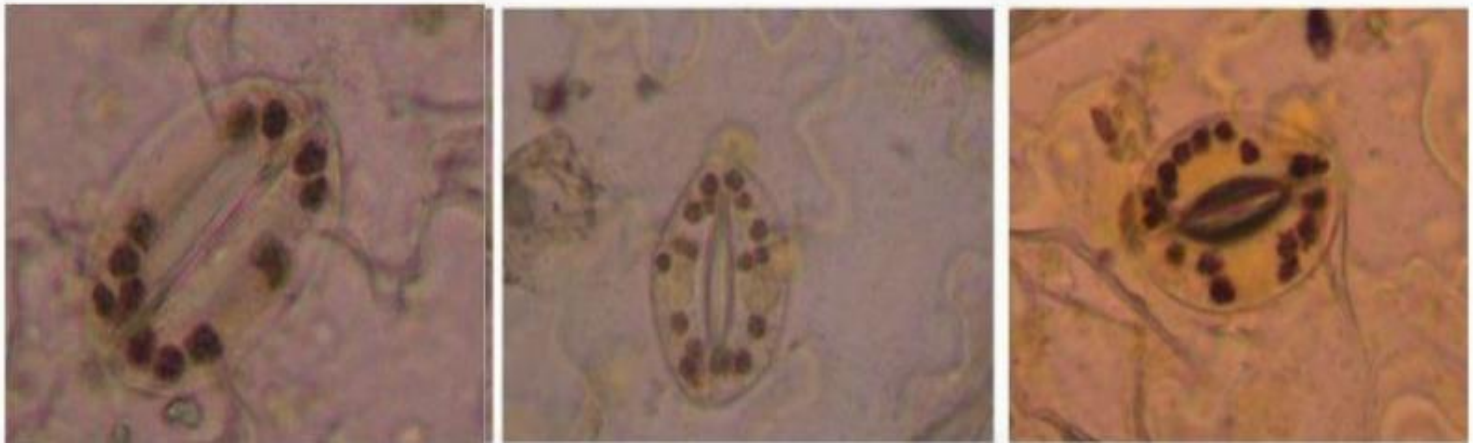
Haploid bitkilerin tanımlanması

Stoma bekçi hücrelerinde kloroplast sayıları

Anthurium



D) Haploid cell with 19, E) Diploid cell with 30, F) Triploid cell with 52 chloroplasts



Chrysanthemum

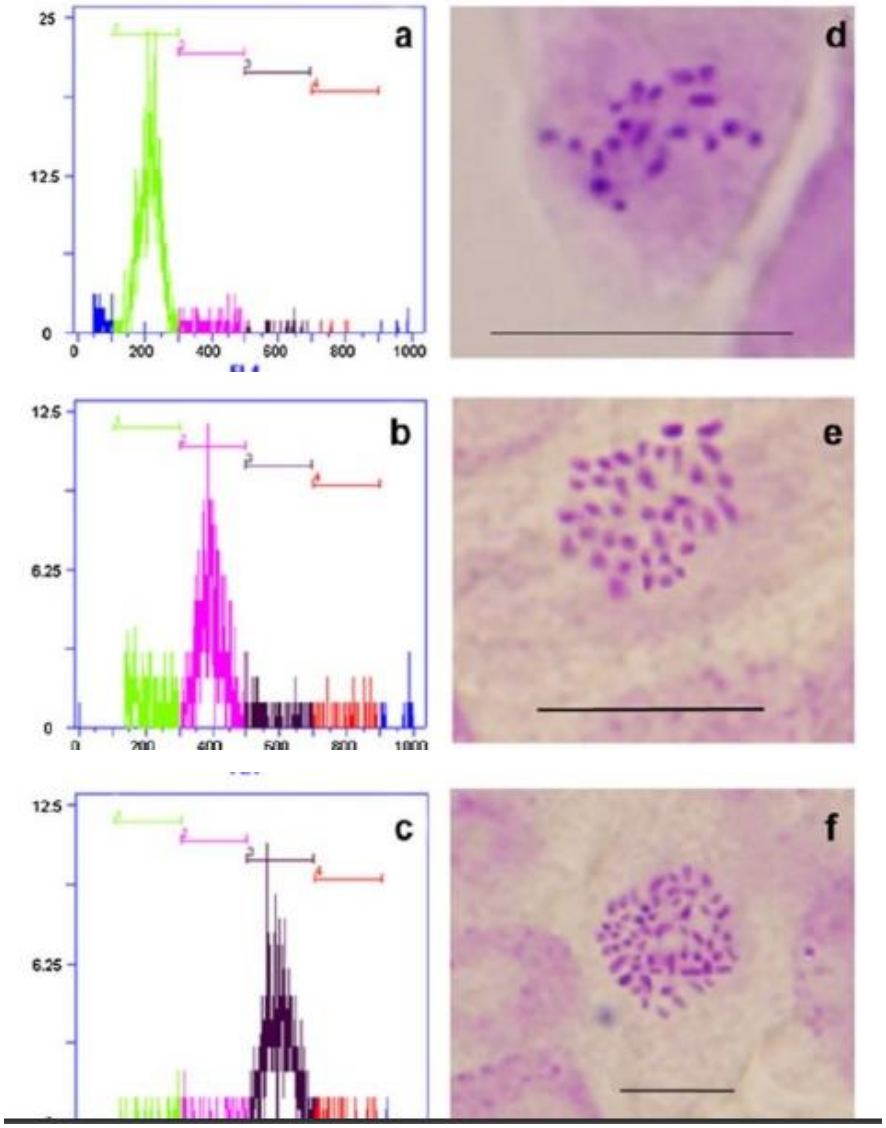
Haploid Bitkilerin Tanımlanması

Bitkilerin ploidi seviyesinin flow sitometri (a-c) ve kromozom sayımı (b-f) ile belirlenmesi.

Haploid bitkinin histogramı (a) ve kromozom sayısı (d)(n=x= 19)

Diploid bitkinin histogramı (b) ve kromozom sayısı (e)(2n=2x= 38)

Triploid bitkinin histogramı (c) ve kromozom sayısı (f)(3n=3x= 57)



KOMBİNASYON YETENEĞİ ÜSTÜN HATLARIN BELİRLENMESİ

Heterozis veya F_1 hibrit gücü, ancak kombinasyon yeteneği (genel ve özel) üstün hatlar arasında yapılan melezlemelerde ortaya çıkar. Genel ve özel kombinasyon yeteneklerinin belirlenmesi için eşleştirmeler yapılır. Eşleştirme deseninin seçiminde;

- *Tozlanma ve döllenme biyolojisine (kendine veya yabancı)*
- *Melezleme yöntemi ve tekniği (yapay veya doğal)*
- *Polen yayma şekli (böcekle veya rüzgarla)*
- *Erkek kısırlık sisteminin varlığı ve türü (GMS, CMS ve CGMS)*
- *Çalışmanın amacı ve hedefi (ıslah veya genetik)*
- *Popülasyon büyüklüğü* ve çeşitliliği etkilidir.

Eşleştirme deseni veya tasarımı döl (nesil) üretme prosedürlerini ve düzenlemeleri kapsar. Yaygın kullanılan eşleştirme yöntemleri;

- *Bi-parental*
- *Polycross*
- *Topcross*
- *Line x tester*
- *Diallel (I, II, II, IV)*
- *Kuzey Carolina (I, II, III)*

Genel ve Özel Kombinasyon Yetenekleri

- Genel kombinasyon yeteneği (GKY), bir ebeveynin ıslah değeri ile doğrudan ilişkilidir ve **(eklemeli) aditif gen etkisi** ile ilişkilidir. Bir geneotipin melezlerinin genel popülasyonun ortalamasından sapmayı ifade eder.
- Özel kombinasyon yeteneği (ÖKY), ağırlıklı olarak **dominantlık, epistasi, süperdominatlık veya genotip × çevre etkileşimi (eklemeli olmayan)** etkilerinin sonucu ortaya çıkan bir melezin ıslah değerini ifade eder. Ebeveyn adaylarının değişik hatlarla melezlendiklerinde bunlardan hangileriyle daha iyi uyuştuğunu ifade eden bir yetenek ya da özelliktir.

Bi-parental Eşleştirme

- Bi-parental eşleştirme, iki ebeveyn kullanılarak yapılan klasik eşleştirme desenidir.
- Popülasyonda seçilen n sayıda genotipin çiftler halinde rastgele melezlemesi ile yapılır.
- 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, …….n
- 1x2, 4x3, 5x6, 7x8, 9x10 … n-1 x n melezler oluşturulur.
- Familyalar içinde ve arasında çalışılan özellikler (verim, kalite vs.) açısından analizler yapılarak, ilgili özelliğe ilişkin genetik parametreler tahmin edilir.

Top Cross (Yoklama Melezi)

Elde bulunan tüm hatlar, ayrı ayrı tek bir ebeveynle (**tester**) melezlenir ve elde edilen F_1 hibrit dölleri kendi aralarında tarımsal değerleri bakımından karşılaştırılır. Eğer test ebeveyni olarak bir hat kullanılmış ise test edilecek F_1 sayısı (n) kadardır. Melezlerinde analizler sonucunda üstün özellikler taşıyan hatlar genel kombinasyon yeteneği üstün hatlar olarak seçilir.

En önemli konu, Top Cross'ta **Test Hattının** seçimidir. Bilinen bir çeşit/hat olması değerlendirmeyi kolaylaştırır.

- Her bir melez test ebeveyni ve ilgili hat ile karşılaştırılabilir.

  GKYx = Melez – X 'in değeri (Test hattı + X)/2

- Her bir melezin performansı bütün melezlerin ortalaması ile karşılaştırılabilir

  GYKx = X'melezinin değeri – Bütün melezlerin ortalaması

Test Hattında Bulunması Gereken Özellikler

1. Test materyali genetik yapı bakımından, kombinasyon yeteneği testi yapılacak hatlardan uzak olmalıdır.
2. Genetik yapısı homojen olmalıdır. Böylece döller arasındaki farklılığın, test edilen materyalden kaynaklandığından emin olmak mümkün olabilir.
3. Test hattı, ıslah edilecek çeşidin yetiştiği iklime adaptasyonunun sağlamış olmalıdır. Yetiştirilmesinde sorun çıkmamalıdır.
4. Test hattında, erkek kısırlığının bulunması, işlemin çok pratik yapılmasını sağladığından bulunması tercih edilecek bir özelliktir.

GKY testinde iyi sonuçlar veren ebeveyn adayları özel kombinasyon yeteneği (**ÖKY**) testine alınır

Poly Cross (Çoklu Melez Testi)

Elimizde çok sayıda birey (hat) var ise Poly Cross yapılabilir.

Tüm ebeveyn adaylarından toplanan polenler homojen bir şekilde karıştırılır ve bütün bireyler bununla tozlanır veya yabancı tozlananlarda, izole edilerek ayrılmış bir polycross bloğunda bir hat kendine tozlaşmayı engelleyecek şekilde aynı bloktaki diğer bütün genotiplerle tozlaşabilecek şekilde yetiştirilir (Latin kare deneme deseni kullanılabilir).

Elde edilen tohumlar (melezler) istenilen özellikler açısından değerlendirilir. Ebeveynlerden yüksek değer verenlerin GKY yüksek olarak değerlendirilir.

- Her bir hat melezi ile karşılaştırılabilir.

  GKY= Hattın değeri ↔X melezin değeri [(Melez –Hat)/ Hat] *100

- Her bir melez, bütün melezlerin ortalaması ile karşılaştırılabilir.

  GKY_x= Melezlerin ortalaması ↔ X melezinin değeri

  [(Melez-Melezlerin ort.)/Melez Ort]*100

Latin Karesinde polycoss desen (4 hat için)

1*	2	3	4	2	4	1*	3
2*	4	1	3	4	3	2*	1
3*	1	4	2	1	2	3*	4
4*	3	2	1	3	1	4*	2
3*	1	4	2	4	3*	2	1
1*	2	3	4	3	1*	4	2
4*	3	2	1	2	4*	1	3
2*	4	1	3	1	2*	3	4

* Kendine tozlanması engellenecek

Polycross için ANOVA

	SD	BKO
Döller	g-1	$\sigma^2_{Ç} + r\sigma^2_{(döller)}$
Tekkerrür	r-1	
Hata	(g-1)x (r-1)	$\sigma^2_{Ç}$

SD: Serbestlik derecesi

BKO: Beklenen kareler ortalaması

Varyans bileşenleri

Döller için $r\sigma^2_{(döller)} = COV(HS) = (1+F/4) \times \sigma_A^2$

Hata için= σ^2

Line x Tester

- Bu yöntem hem kendine hem de yabancı döllenen türlerde genel ve özel kombinasyon yeteneğini belirlemede kullanılabilir.
- Line x Tester, Topcross'un farklı bir uygulama şeklidir.
- Bu yöntem, erken kuşakta ümitvar melez popülasyonların belirlenmesine imkan tanıdığı gibi az sayıda ümitvar melez popülasyonla çalışmaların devamını da mümkün kılar.
- Line-Tester'da belirli sayıda ana hat, baba olarak bir grup tester ile mümkün olan bütün kombinasyonlarda melezlenir (Ör: 5 ana ve 3 baba hat kullanarak 5 x 3 =15 melez kombinasyon elde edilir).
- İlgili karakterlerle ilgili denemeler yapılır ve sonuçlara bağlı olarak genel (GKY) ve özel kombinasyon yetenekleri (ÖKY) hesaplanır.
- GKY eklemeli gen etkilerine, ÖKY ise genlerin eklemeli olmayan etkilerine dayanır,.
- GKY ve ÖKY'lerinin değerlendirilmesinde eklemeli gen varyansı (σ^2_A) ve dominant gen varyansı (σ^2_D) değerleri oranlanır.
- σ^2_A / σ^2_D oranının 1'den küçük olması **eklemeli olmayan genlerin** etkili olduğunu, σ^2_D / σ^2_A oranının 1'den büyük olması **üstün dominantlık** bulunduğunu ifade eder.
- Pozitif ve önemli GKY ve ÖKY değerleri veren hatlar ebeveyn olarak değerlendirilir.

Örnek:

Altı hat ve 3 tester ile mısırda yapılan bir çalışmada dane verimi ile ilgili genel ve özel kombinasyon yeteneklerinin belirlenmesi. Melezler ve ebeveynler kullanılarak yapılan verim denemesine göre **varyans analiz** yapılır ve önemli çıkarsa ana ve baba (tester) iki yanlı çizelge oluşturulur (Tezel, 2007).

İki yanlı çizelgelerin oluşturulmasında tekerrürlerin ortalaması kullanılır

Mısırda tane veri için 6x3 line tester analizinde iki yanlı çizelge				
Ana hat	Baba (tester)			Toplam
	ADK451	B73	MO17	
ADK697	1355,5	1086,97	956,1	1132,86
ADK694	1410,07	965,467	999,133	1124,89
ADK545	1173,1	1348,97	978,567	1166,88
ADK447	1462,6	979,567	1411,4	1284,52
FR13	1373,33	1208,83	458,8	1013,66
ADK307	1328,1	1054,9	1248,23	1210,41
Toplam	1350,45	1107,45	1008,71	1155,9

$ADK697_{GKY}$ = (1132,86) – (1155,9)
= -23,09

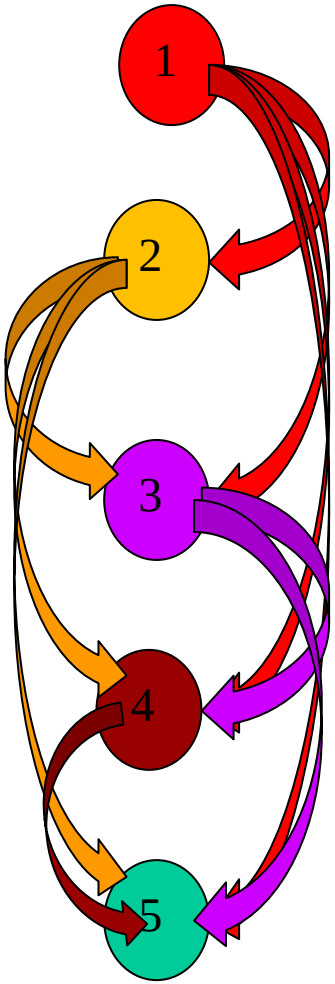
$ADK451_{GKY}$ = (1350,45) –(1155,9)
= 195,73

ADK697 x $ADK451_{ÖKY}$
= (1355,5)-(1132,86) - (1350,45) + (1155,94)
= 26,92

Hatların GKY = A'nın melezlerinin ort. – Genel ort.
Testerların GKY = Tester melezlerinin ort. – Genel ort.
Hatların ÖKY = Hatlara (AxB) ait melezin ort.- Hattın melezlerinin ort. – Testerın ort. + Genel ort.

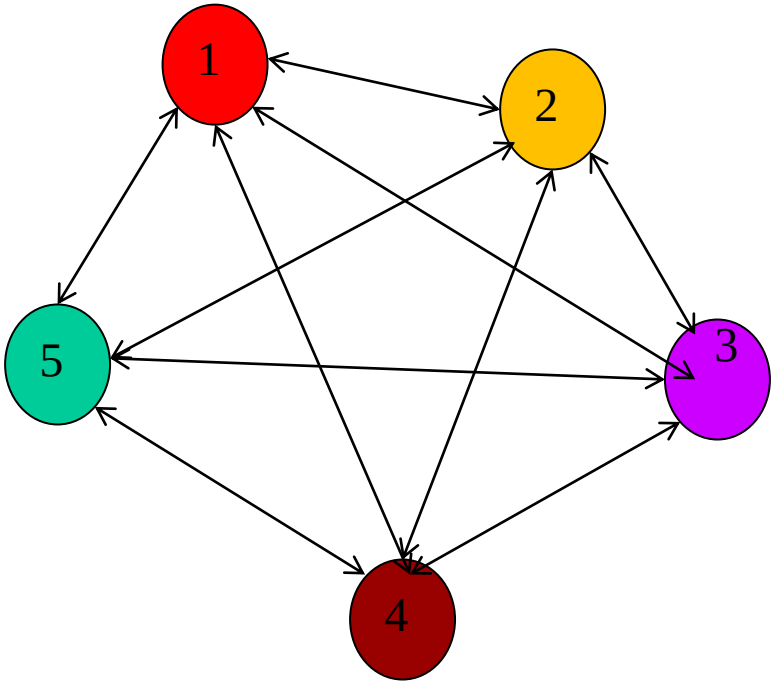
Diallel Melezleme

- Diallel melezleme, hem yabancı döllenen hem de kendine döllenen türlerde kompleks kalıtım gösteren karakterlilerin analizinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Hayman ve Jinks, 1954; Griffin, 1956).
- Melez çeşit ıslahında ebeveynlerin GKY ve ÖKY'lerinin tespit edilmesinde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır.
- İlgili karakterlerden sorumlu olan genlerin aksiyon şekillerinin tahmin edilmesinde ve seleksiyon yöntemlerinin belirlenmesinde de kullanılmaktadır.
  - Ör: *Eklemeli genler önemli ise Pedigri yöntemi ile F_2'den sonra, eklemeli olmayan genler etkili ise Bulk yöntemi ile F_{5-6} gibi ileri generasyonlardan sonra seleksiyona başlanması tavsiye edilir.*
- Diallel melezlemede hatların tüm olası kombinasyonları resiproklü veya rsiproksüz olarak yapılabilmektedir.
- Diallel melezlemenin güvenirliği bakımından;
  - *Hatların/ebeveynlerin homozigot oldukları*
  - *Her gen çifti için diploid açılma olduğu*
  - *Resiprok melezlerin birbirinden farksız olduğu*
  - *Genlerin bağımsız olarak dağıldığı*
  - *Çoklu allelliğin bulunmadığı*
  - *Epistasisnin olmadığı*
  - *Genotip x çevre interaksiyonunun* olamadığı varsayılır.
- Ebeveynlerin GKY ve ÖKY belirlenmek isteniyor ise Griffin modeli, ebeveynlerin GKY ve ÖKY'leri ile geniş ve dar anlamda kalıtım dereceleri belirlenmek isteniyor ise Jink-Hayman modeli uygulanır.



KISMİ DİALLEL MELEZLEME

n(n-1)/2



TAM DİALLEL MELEZLEME n(n-1)

	1	2	3	4	5
1	⊗	1*2	1*3	1*4	1*5
2	2*1	⊗	2*3	2*4	2*5
3	3*1	3*2	⊗	3*4	3*5
4	4*1	4*2	4*3	⊗	4*5
5	5*1	5*2	5*3	5*4	⊗

Diallel Melezlemedeki Muhtemel Birey Sayıları

Griffin (1956)' tarafından ebeveynlere, F1'lere ve resiproklu/resiproksüz melezlemelere bağlı olarak dört farklı yöntem geliştirilmiştir

Ebeveyn sayısına göre Griffin (1956) genotip sayısı					
	Değerlendirilen genotipler	Genotip sayısı	n=5	n=10	n=20
1	Ebeveynler, F1, ve resiprok melezler	n^2	25	100	400
2	Ebeveynler ve F1'ler	n(n+1)/2	15	55	210
3	F1'ler ve resiprok melezler	n(n-1)	20	90	380
4	F1'ler	n(n-1)/2	10	45	190

Ebeveynler, resiprokal (karşılıklı) melezler

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
A	AA	AB	AC	AD	AE	AF	AG	AH	AI	AJ
B	BA	BB	BC	BD	BE	BF	BG	BH	BI	BJ
C	CA	CB	CC	CD	CE	CF	CG	CH	CI	CJ
D	DA	DB	DC	DD	DE	DF	DG	DH	DI	DJ
E	EA	EB	EC	ED	EE	EF	EG	EH	EI	EJ
F	FA	FB	FC	FD	FE	FF	FG	FH	FI	FJ
G	GA	GB	GC	GD	GE	GF	GG	GH	GI	GJ
H	HA	HB	HC	HD	HE	HF	HG	HH	HI	HJ
I	IA	IB	IC	ID	IE	IF	IG	IH	II	IJ
J	JA	JB	JC	JD	JE	JF	JG	JH	JI	JJ

KOMBiNASYON SAYISI= n^2

Ebeveynler ve bir set F1: [n (n+1)]/2 kombinasyon

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
A	AA	AB	AC	AD	AE	AF	AG	AH	AI	AJ
B		BB	BC	BD	BE	BF	BG	BH	BI	BJ
C			CC	CD	CE	CF	CG	CH	CI	CJ
D				DD	DE	DF	DG	DH	DI	DJ
E					EE	EF	EG	EH	EI	EJ
F						FF	FG	FH	FI	FJ
G							GG	GH	GI	GJ
H								HH	HI	HJ
I									II	IJ
J										JJ

KOMBiNASYON SAYISI= [n(n+1)]/2

Ebeveynsiz resiprokal melezleme n (n-1) kombinasyon

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
A		AB	AC	AD	AE	AF	AG	AH	AI	AJ
B	BA		BC	BD	BE	BF	BG	BH	BI	BJ
C	CA	CB		CD	CE	CF	CG	CH	CI	CJ
D	DA	DB	DC		DE	DF	DG	DH	DI	DJ
E	EA	EB	EC	ED		EF	EG	EH	EI	EJ
F	FA	FB	FC	FD	FE		FG	FH	FI	FJ
G	GA	GB	GC	GD	GE	GF		GH	GI	GJ
H	HA	HB	HC	HD	HE	HF	HG		HI	HJ
I	IA	IB	IC	ID	IE	IF	IG	IH		IJ
J	JA	JB	JC	JD	JE	JF	JG	JH	JI	

KOMBiNASYON SAYISI= n(n-1)

Ebeveynsiz tek yön melezleme [n(n-1)]/2 kombinasyon

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
A		AB	AC	AD	AE	AF	AG	AH	AI	AJ
B			BC	BD	BE	BF	BG	BH	BI	BJ
C				CD	CE	CF	CG	CH	CI	CJ
D					DE	DF	DG	DH	DI	DJ
E						EF	EG	EH	EI	EJ
F							FG	FH	FI	FJ
G								GH	GI	GJ
H									HI	HJ
I										IJ
J										

KOMBiNASYON SAYISI= n(n-1)/2

Örnek:

	B	C	D	E	F	G	H	I	J	Toplam	GCA
A	26	24	29	28	22	21	27	21	28	226	2,95
B		21	35	30	26	22	29	14	19	222	2,45
C			26	21	10	14	13	17	23	169	-4,18
D				25	31	32	28	21	18	245	5,33
E					13	23	15	15	14	184	-2,30
F						20	31	17	15	185	-2,18
G							32	14	12	190	-1,55
H								35	38	248	5,70
I									17	171	-3,93
J										184	-2,30
Toplam										**2024**	**0,00**

Griffing, 1956'a göre diallel melezlemede GKY formülü

$$Gx = [Tx/(n-2)] - [\Sigma T/n(n-2)]$$

A hattı için genel kombinasyon yeteneği

$$GA = [TA/(n-2)] - [\Sigma T/n(n-2)]$$
$$= [226/(10-2)] - [2,024/10(10-2)]$$
$$= 28,25 - 25,3$$
$$= 2,95$$

Özel kombinasyon yeteneği

$$X_{AB} = X + G_A + G_B + ÖKY_{AB}$$

Genel ortalama, A'nın GKY, B'nin GKY, AB'nin ÖKY

CxD melezi için özel kombinasyon değeri değer

$$26 = 22.49 + (-4,18) + 5,33 + GKY_{CD}$$
$$26 = 23,64 + SCA_{CD}$$
$$ÖKY_{CD} = 26 - 23,64$$
$$= 2,36$$

F1 HİBRİT TOHUMLUK ÜRETİLMESİ

F1 hibrit tohumluklarını her yıl üretmek ve yenilemek zorunludur.

TÜRÜN ÇİÇEK BİYOLOJİSİ, tohumluk üretimindeki en önemli noktadır.

a. Dioik türlerde ana bitkinin yetiştirildiği parseldeki erkek bitkiler, tozlama aşamasına gelmeden önce sökülür, yanyana yetiştirilen baba ebeveynin tozlayıcı olması sağlanmış olur.

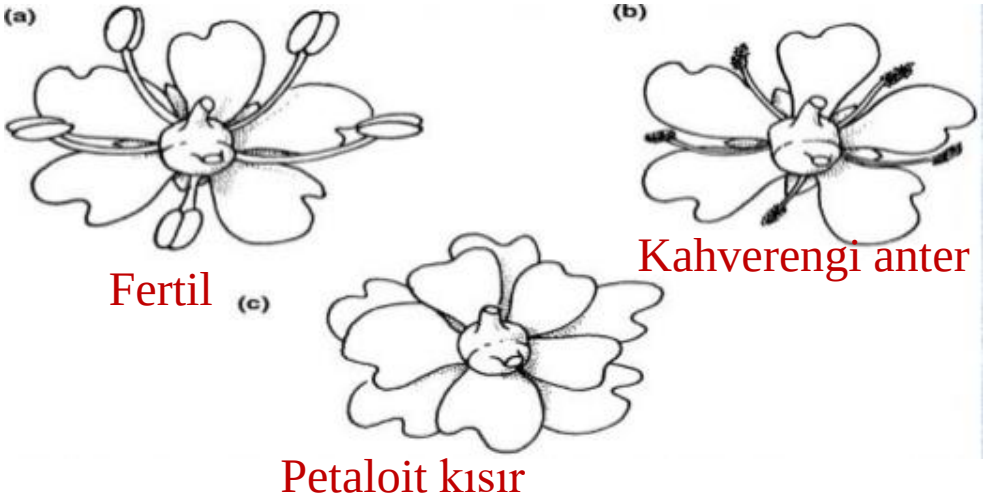
b. Monoik türlerde, ana ebeveyndeki bitkilerde bulunan açmamış durumdaki erkek çiçekler kopartılır.

c. Erselik türlerde ise mutlaka emaskülasyon yapmak gerekmektedir. En fazla maliyeti olan kısım burasıdır. Çünkü tek tek çiçeklerin erkek organlarının kopartılması ve baba ebeveynin çiçek tozlarıyla tozlanması titizlik gerektiren ve vakit alıcı bir iştir.

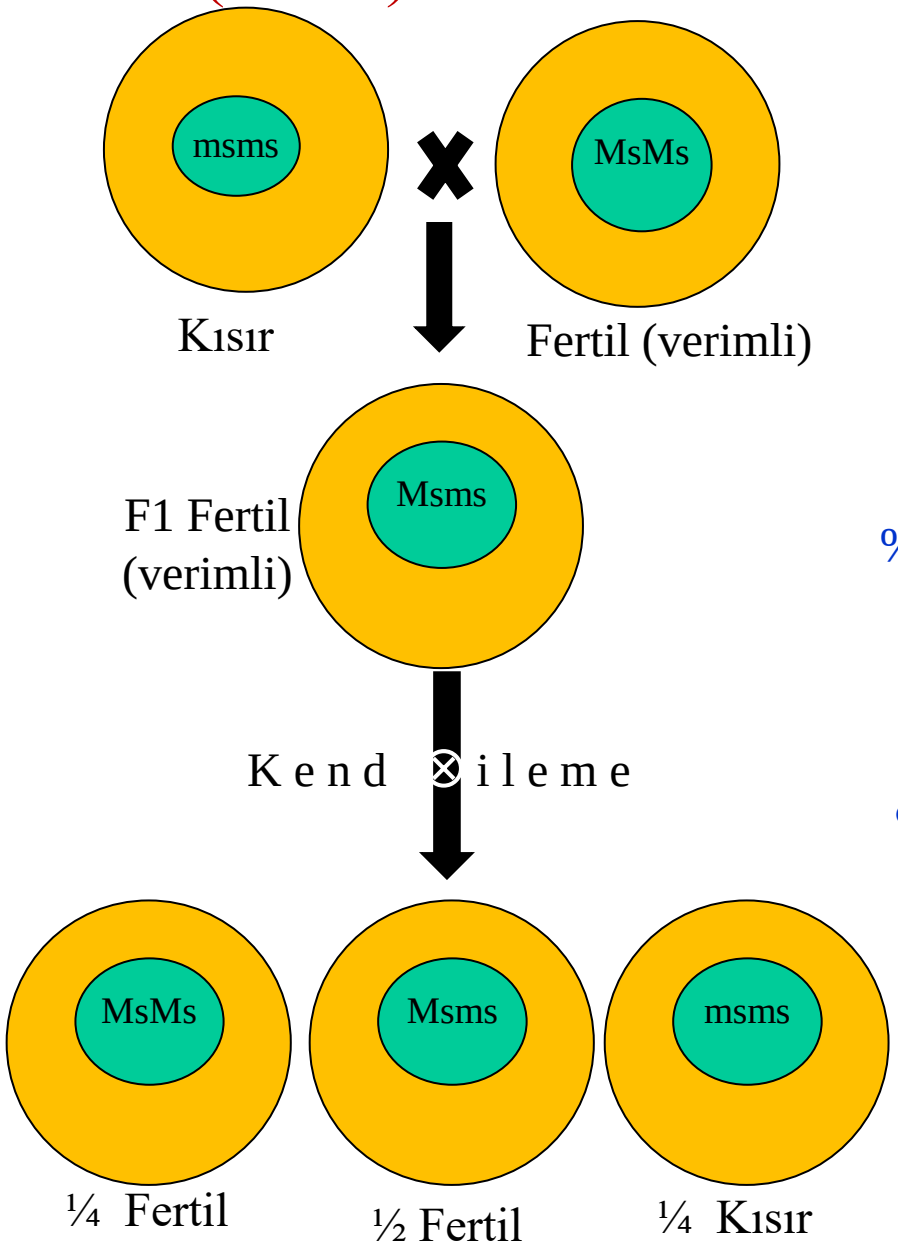
DRY ANTHERS
FOR 24 HOURS
AT 30°C

Erkek Kısırlık

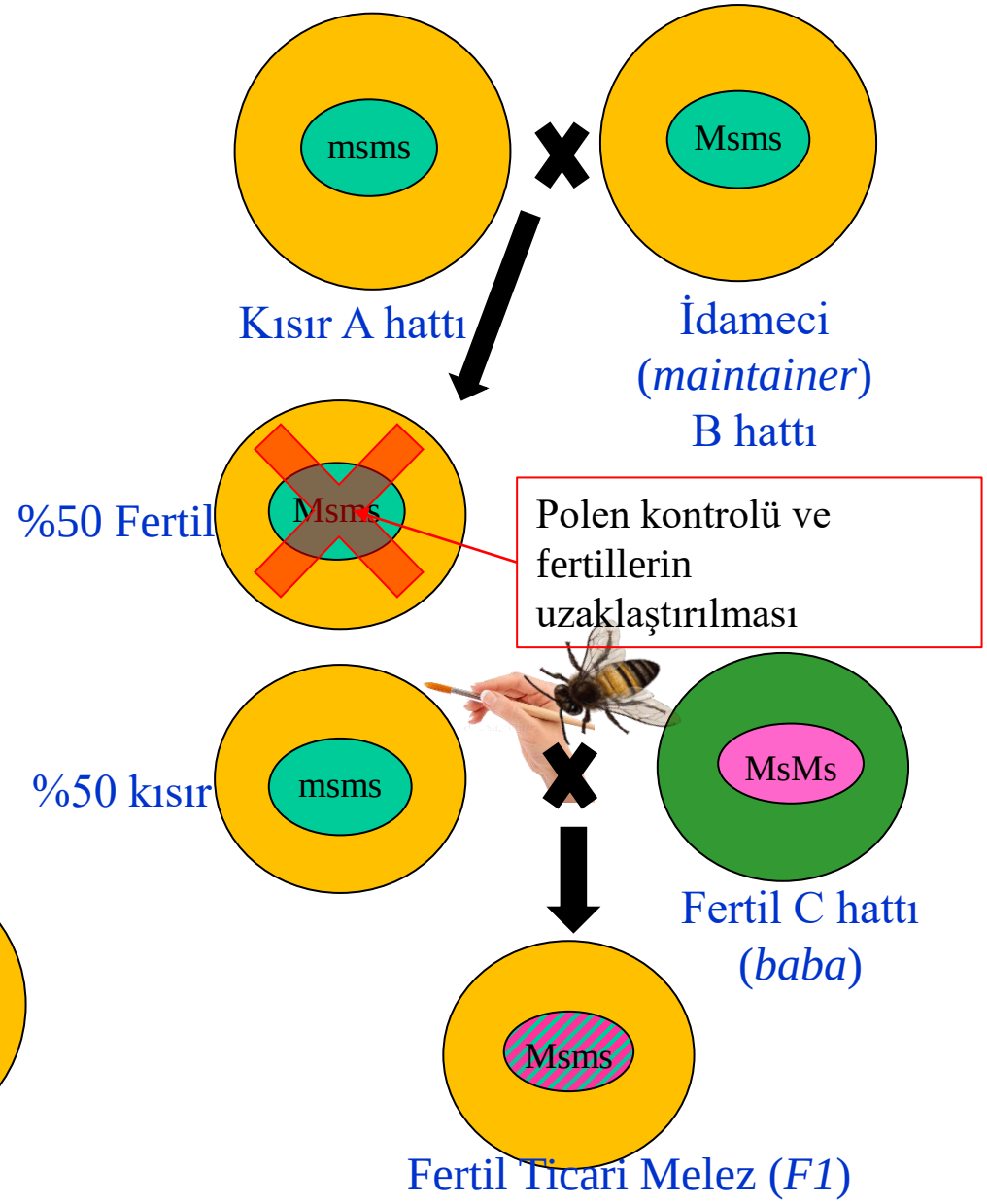
- Genetik erkek kısırlık (GMS)
- Sitoplazmik erkek kısırlık (CMS)
- Genetik-sitoplazmik erkek kısırlık (CGMS)



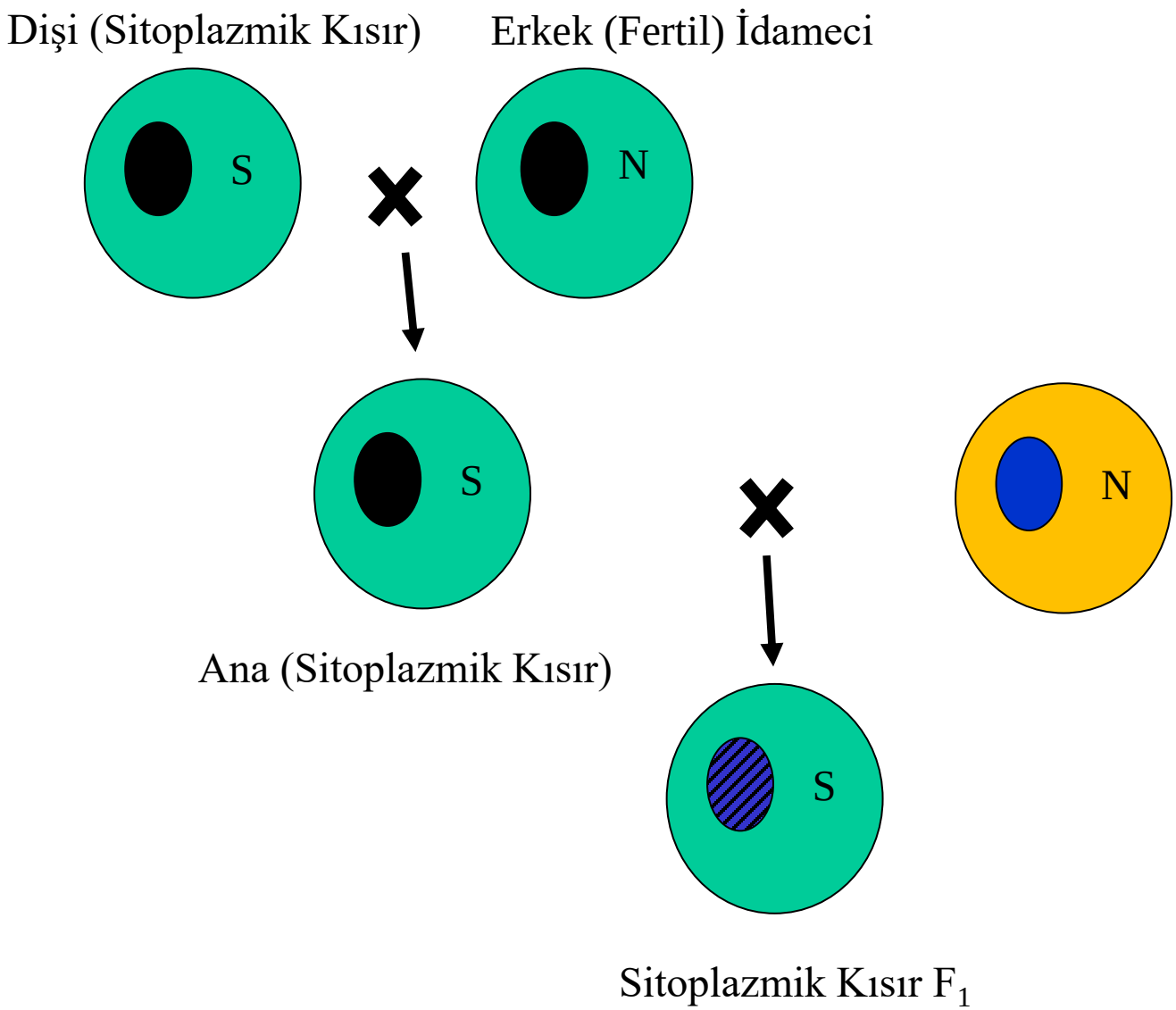
Genik Erkek Kısırlığın (GMS) Kalıtımı



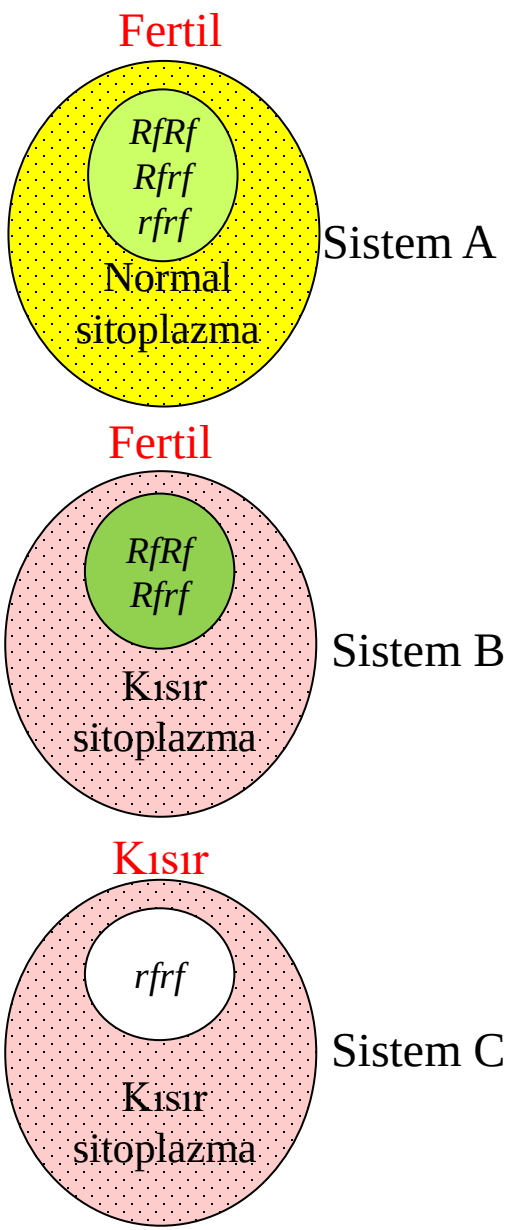
Genik Erkek Kısırlığın Kullanımı



Sitoplazmik Erkek Kısırlık (CMS)

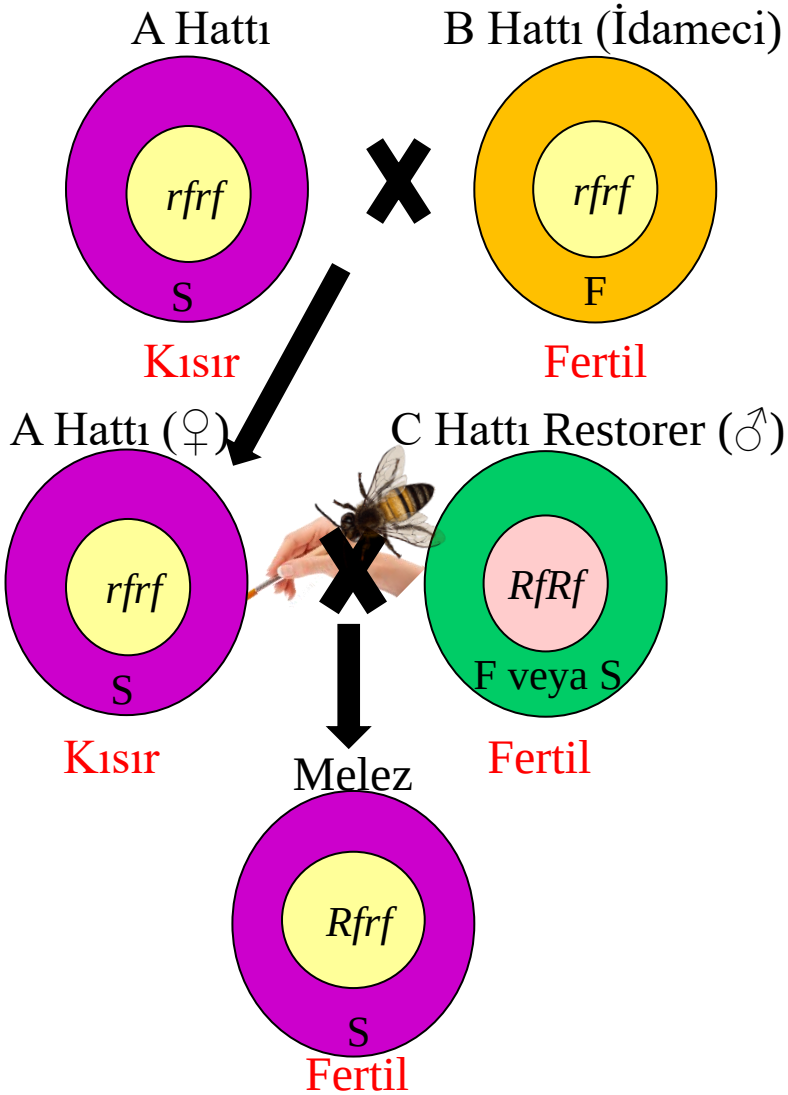


Genetik-Sitoplazmik Erkek Kısırlık (CGMS)

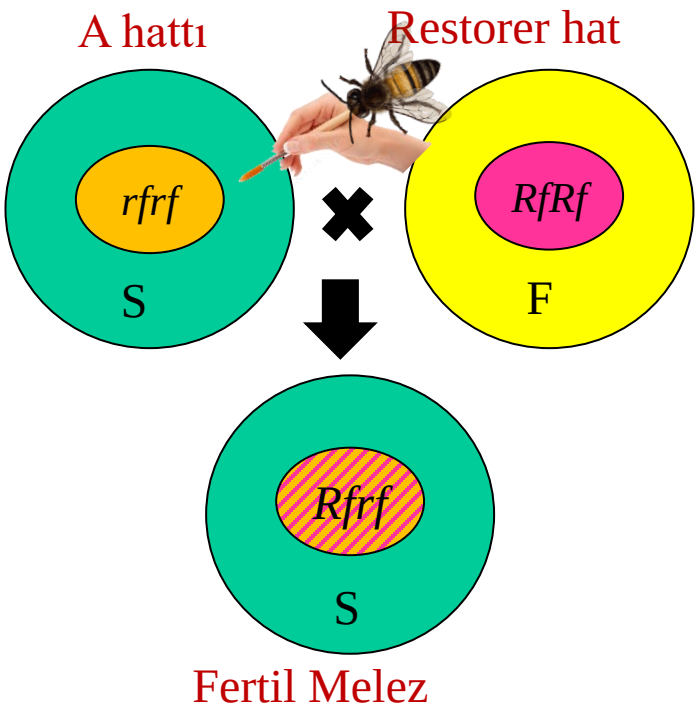


CGMS ile F_1 Tohum Üretimi

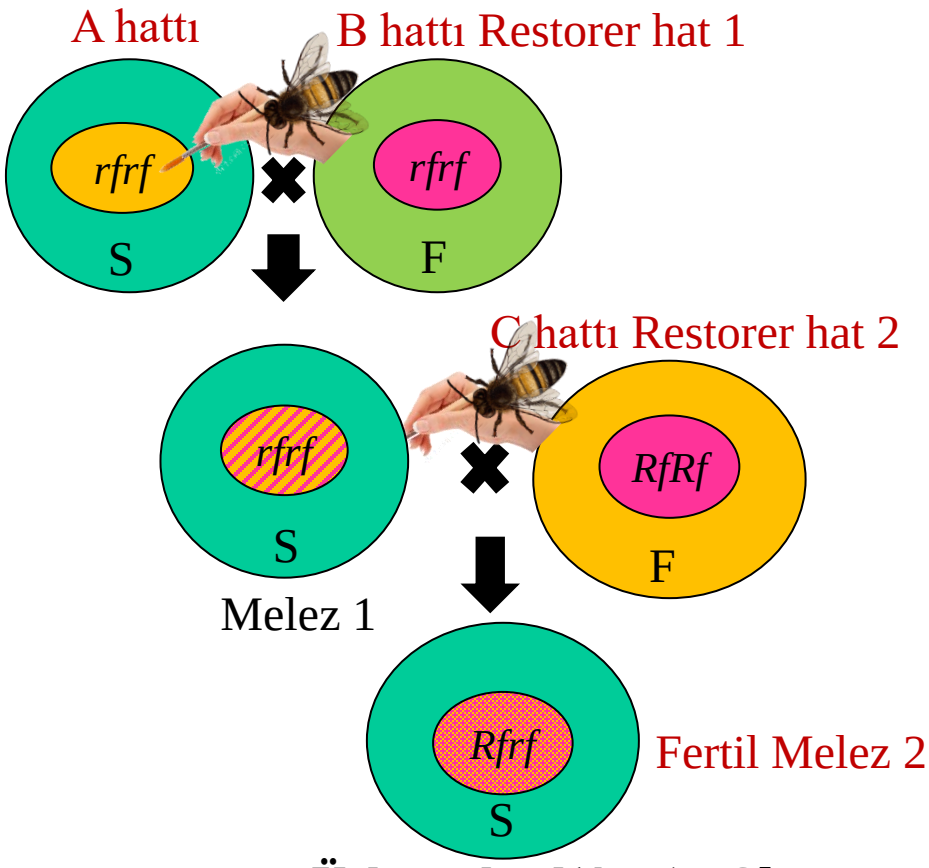
A: Erkek kısır hat
B: Maintainer hat
C: Restorer hat



CGMS Destekli Tekli ve Üçlü Melez Üretimi

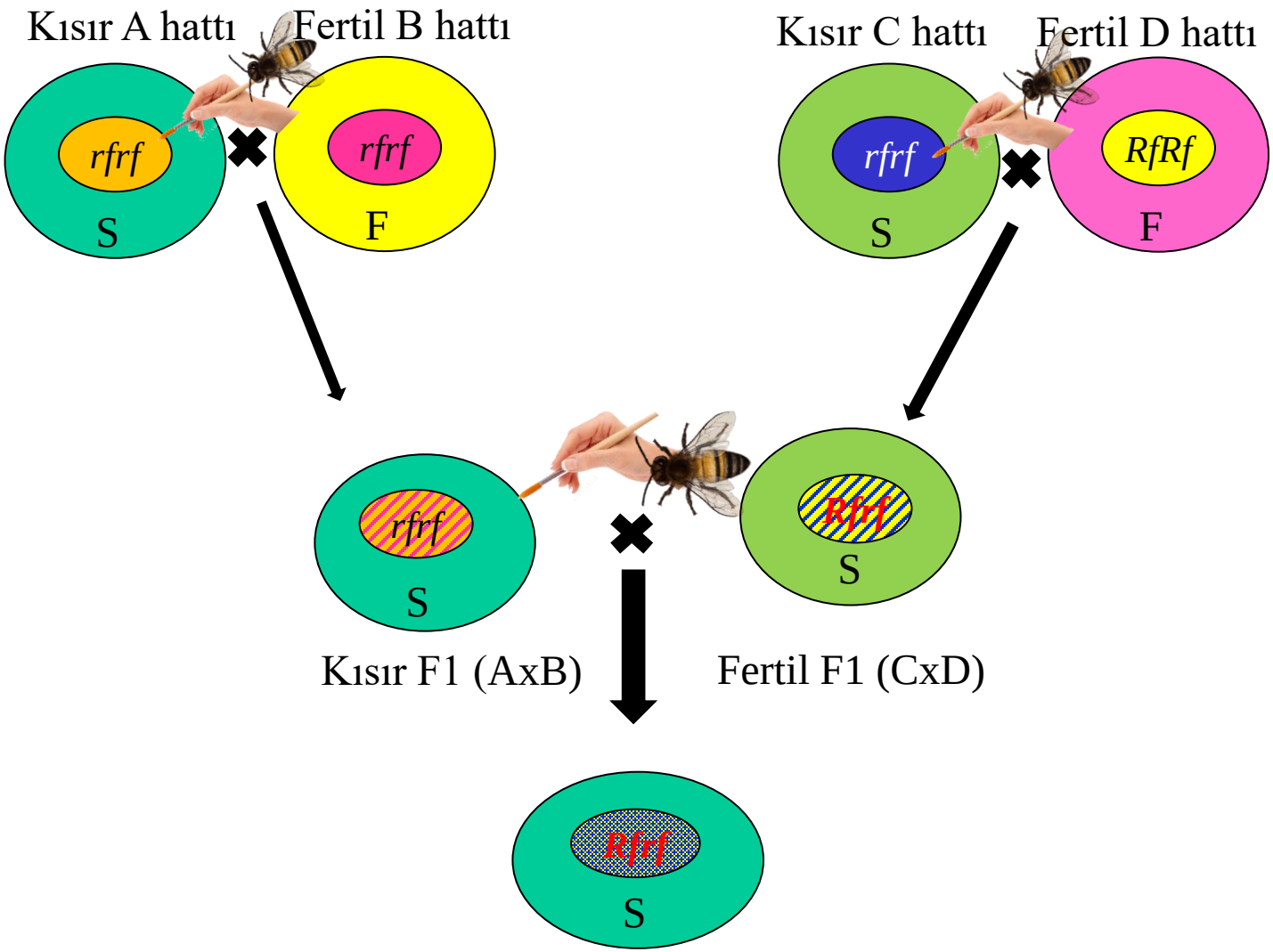


Tek melez (AxB)



Üçlü melez [(AxB) xC]

CGMS Destekli Çift Melez Üretimi



% 50 Fertil ve %50 kısır çift melez [(AxB) x(CxD)]

Biberde Sitoplazmik erkek kısır (CMS) hat geliştirilmesi

CMS hattın temini (*Srfrf*) (mevcutlardan veya yeni seleksiyon) (WVCT)

↓

İdameci olabilecek biber hatları ile CMS' nin melezlenmesi

↓

F1 generasyonunda erkek kısırlık gözlemlerinin yapılması % 70 MS olanların (*Nrfrf*)

↓

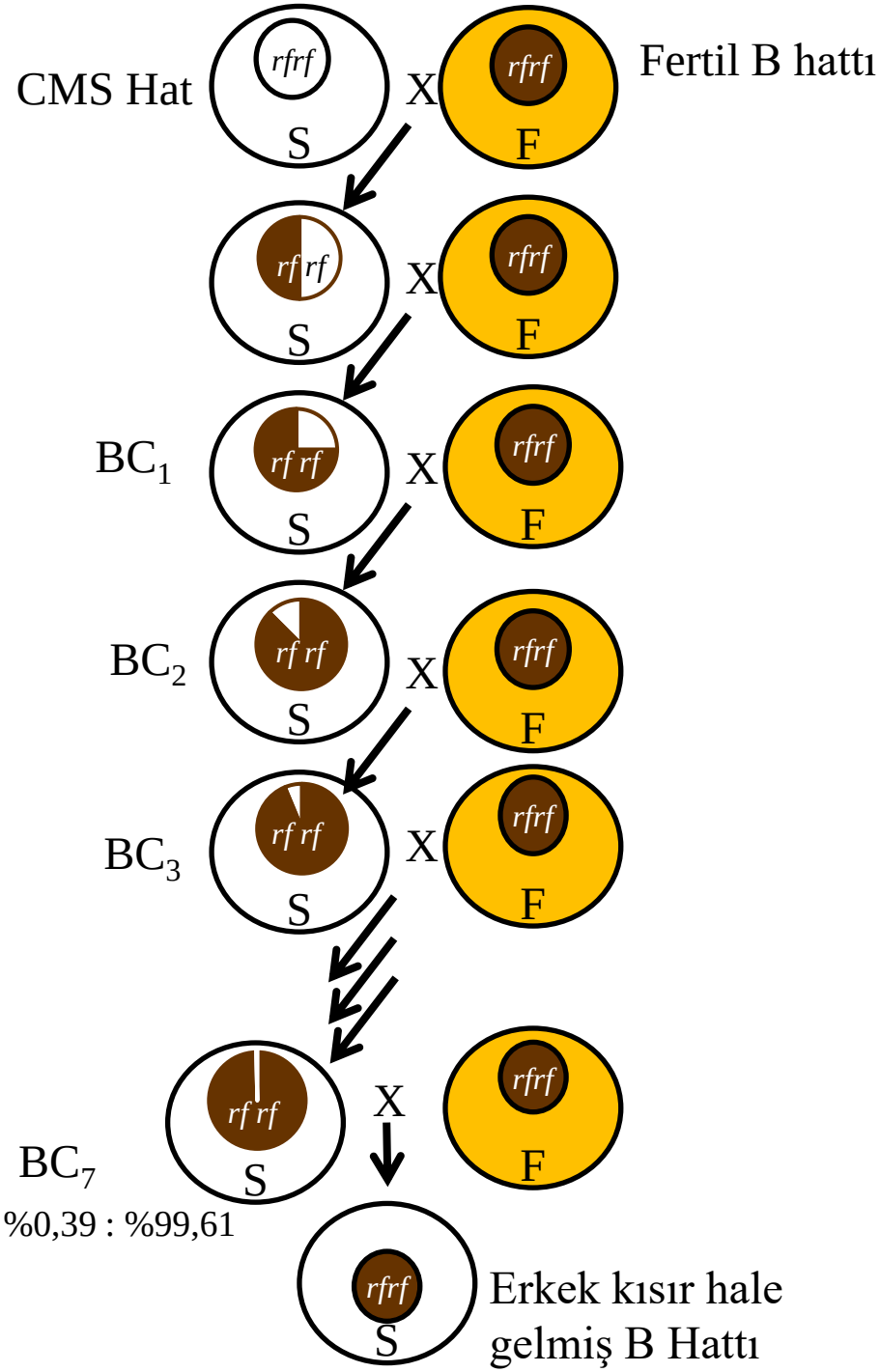
İdameci hat adayları ile %70 MS veren F1'lerin tek bitki üzerinden geriye melezlenmesi (CMS-A hatlarının geliştirilmesi) yeterli seviyede MS (*polen canlılık, polen salımı ve tohum tutumu*) ve agronomikal özellik kazanıncaya kadar (BC_{5-6})
%70 ve üzeri MS veren idameci hatların kendilenmesi (B hatlarının geliştirilmesi) (8-10 kendileme)

↓

CMS-A ve B hatlarının kısırlık ve agronomikal özellikler açısından değerlendirilmesi ve kombinasyon programlarına hazırlanması

Meena ve ark., 2018

Biberde Sitoplazmik Erkek Kısır (CMS) Hat Geliştirilmesi



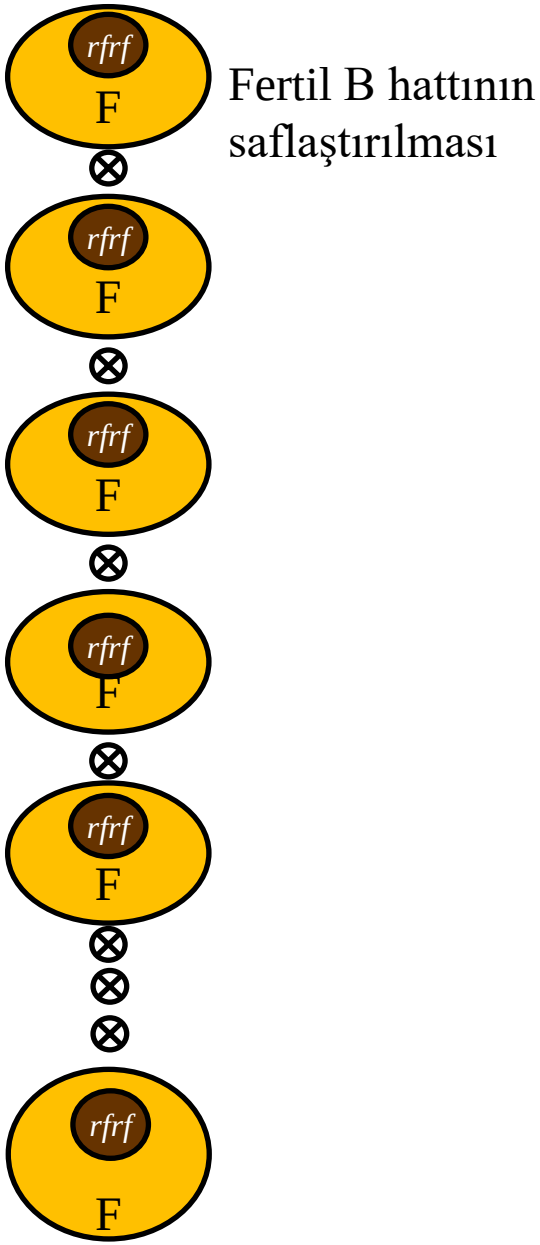


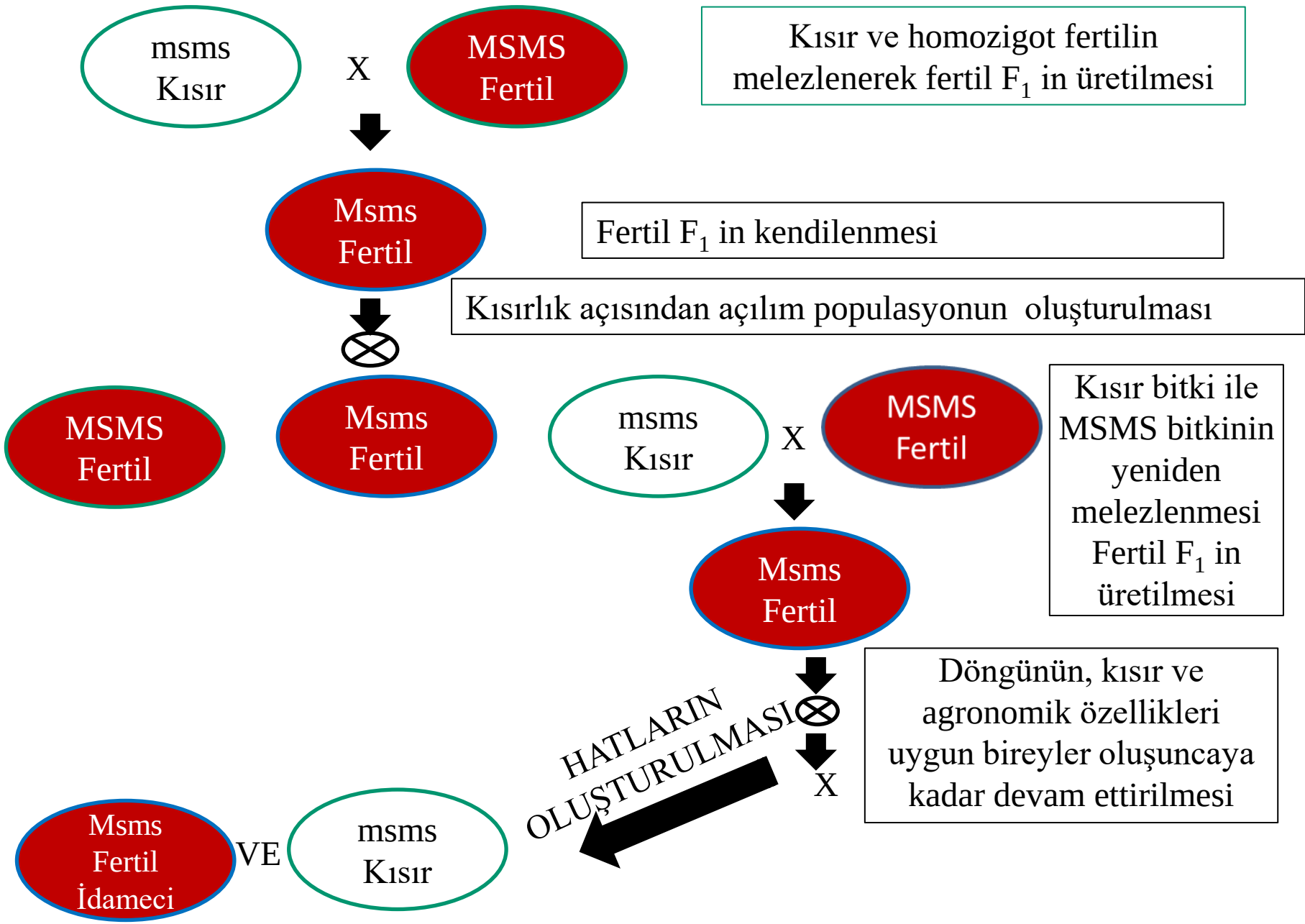
Table 2. Sterile and fertile phenotypes in F_1 generation of 11 test-crosses during 2010

Testcrosses	Number of individuals/plants			
	Total	Sterile	Fertile	% Male sterile plants
CC 141 × MS 341	60	7	53	11.67
CC 141 × SL 461	60	43	17	71.67
CC 141 × SL 462	60	47	13	78.33
CC 141 × DL 161	60	32	28	53.33
CC 141 × EL 181	60	25	35	41.67
CC 141 × US 501	60	0	60	0.00
CC 141 × PA 401	60	0	60	0.00
CC 141 × SD 463	60	44	16	73.33
CC 141 × PP 402	60	0	60	0.00
CC 141 × PS 403	60	0	60	0.00
CC 141 × VR 521	60	4	56	6.67

Table 5. Performance of CMS chilli pepper lines for pollen sterility, pollen release score, fruit setting and number of seed fruit^{-1} under caged conditions

CMS lines^{+}	E_1	E_2	E_3	E_4	Pooled mean
	a. Pollen sterility (%)†				
CMS46113A	81.83 B^{a}	99.17 A	96.59 A	91.37 AB	92.24 b^{b}
CMS4623A	79.68 B	93.73 A	90.14 AB	87.00 AB	87.64 c
CMS4627A	76.44 B	94.99 A	83.15 B	92.86 A	86.86 c
CMS46214A	92.30 A	98.43 A	100.00 A	100.00 A	97.68 a
CMS463L3A	96.89 A	100.00 A	100.00 A	100.00 A	99.22 a
CMS463L9A	74.37 B	93.05 A	78.48 B	91.48 A	84.35 c
CMS463L11A	82.34 A	92.10 A	82.10 A	90.50 A	86.76 c
	b. Pollen release score				
CMS46113A	0.69 A^{a}	0.00 B	0.37 AB	0.43 AB	0.37 b^{b}
CMS4623A	0.74 A	0.37 A	0.43 A	0.51 A	0.51 ab
CMS4627A	0.71 A	0.14 B	0.74 A	0.34 AB	0.48 ab
CMS46214A	0.29 A	0.11 A	0.00 A	0.00 A	0.10 c
CMS463L3A	0.17 A	0.00 A	0.00 A	0.00 A	0.043 c
CMS463L9A	0.69 AB	0.34 B	0.89 A	0.43 B	0.59 a
CMS463L11A	0.51 AB	0.37 B	0.69 A	0.37 B	0.49 ab

Genik Erkek Kısır Hat Geliştirilmesi



A
Male sterile
Male fertile
B
Male sterile
Male fertile

ONION

Male fertile flower

Male sterile flower

HAVUÇ

NORMAL PETALOİD KAHVERENGİ ANTER

LAHANA

FERTİL

KISIR

Kimyasal Polen Kısırlığına Dayalı Melez Tohum Üretimi

- Erkek kısırlığı bulunmayan türlerde polen üretimini engelleyen kimyasallar (sentetik erkek kısırlığı) alternatif bir yoldur.
- Bitkilerde sentetik polen kısırlığına sebep olan kimyasallara **gametositler (CHAs)** denilmektedir.
- Gametositlerin sebep olduğu erkek kısırlığına kimyasal erkek kısırlığı (Ch-MS) denilmektedir.
- Bitkilerde kullanılan bazı gametositler
  - *Dalapon*
  - *Etefon*
  - *Hybrex*
  - *Generis*
  - *6-BAP*
  - *GA_3 .....*
- Türlere göre dönem, doz ve uygulama sayısı belirlenmelidir.
- Ör: Soğanda Çiçeklenme başlangıcında %0.1-0.5 GA_3/GA_7 gametosit etkisi yaparak kısırlığa sebep olmaktadır.

Transgenik Erkek Kısırlığına Dayalı Melez Tohum Üretimi

- Klasik yollarla erkek kısır ve idameci (maintainer) hatların geliştirilmesi zahmetli ve uzun yıllar alan bir süreçtir.
- Genetik mühendisliği ile erkek kısır hatlar üretilebilmektedir.
- Ör:
  - *Bacillus amyloliquefaciens*'ten izole edilen ***Barnase*** geni transfer edildiği bitkide erkek kısırlığa sebep olmaktadır.
  - RNAz enzimini durdurarak normal polen oluşumunu sağlayan ***Barstar*** geni ise ***Barnase*** geninin erkek kısırlık etkisini ortadan kaldırmaktadır.
  - **Barnase** geni taşıyan kısır hat ile **Barstar** geni taşıyan bab hat melezlenerek hibrit tohum üretilebilmektedir (**SeedLink™**).
  - Bu teknolojide erkek kısırlık genine herbisite dayanıklılık geni bağlanmıştır.
  - Herbisite duyarlı olan fertil bitkiler herbisit uygulaması ile öldürülürken kısır bitkilerle melez tohum üretilebilmektedir.
  - Bu teknoloji, kolza, lahana, şikori, karnabahar ve domates gibi türlerde uygulanmıştır.

Emaskulasyon Maliyetinin Azaltılması İçin Erkek Organ Kısırlığı, Uyuşmazlık Ve Kimyasal Maddelerle Emaskülasyon Tekniklerinden Yararlanılmaktadır.

Yararları:

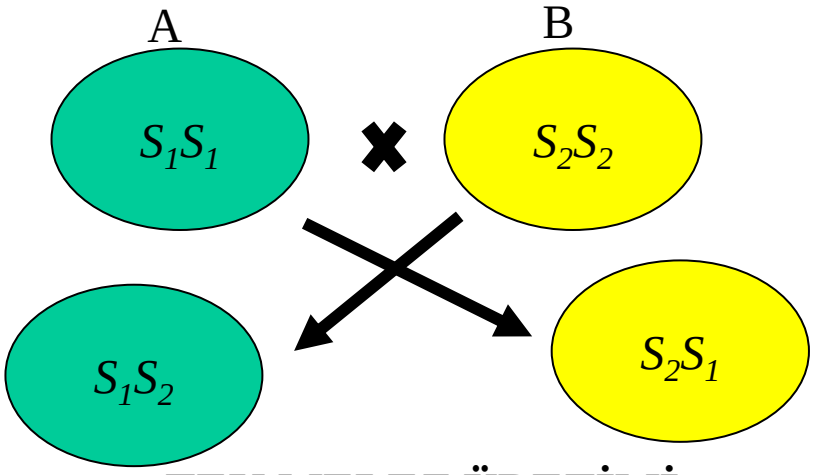
1. Maliyet düşmekte,
2. Kolay ve bol üretim yapılmakta,
3. Unutulacak çiçeklerin kendilenmeye neden olma riski ortadan kalkmakta,
4. Budama ve terbiye işlemlerine gerek kalmamakta,
5. Çiçeğin doğal yapısı bozulmamakta, tohum verimi yüksek olmakta,
6. Tozlanma, çiçeğin reseptif olduğu dönemde yapılmakta,
7. Virüs hastalıkları gibi temasla bulaşan hastalıklar yayılmamaktadır.

Böcekle tozlama mümkün olmaktadır

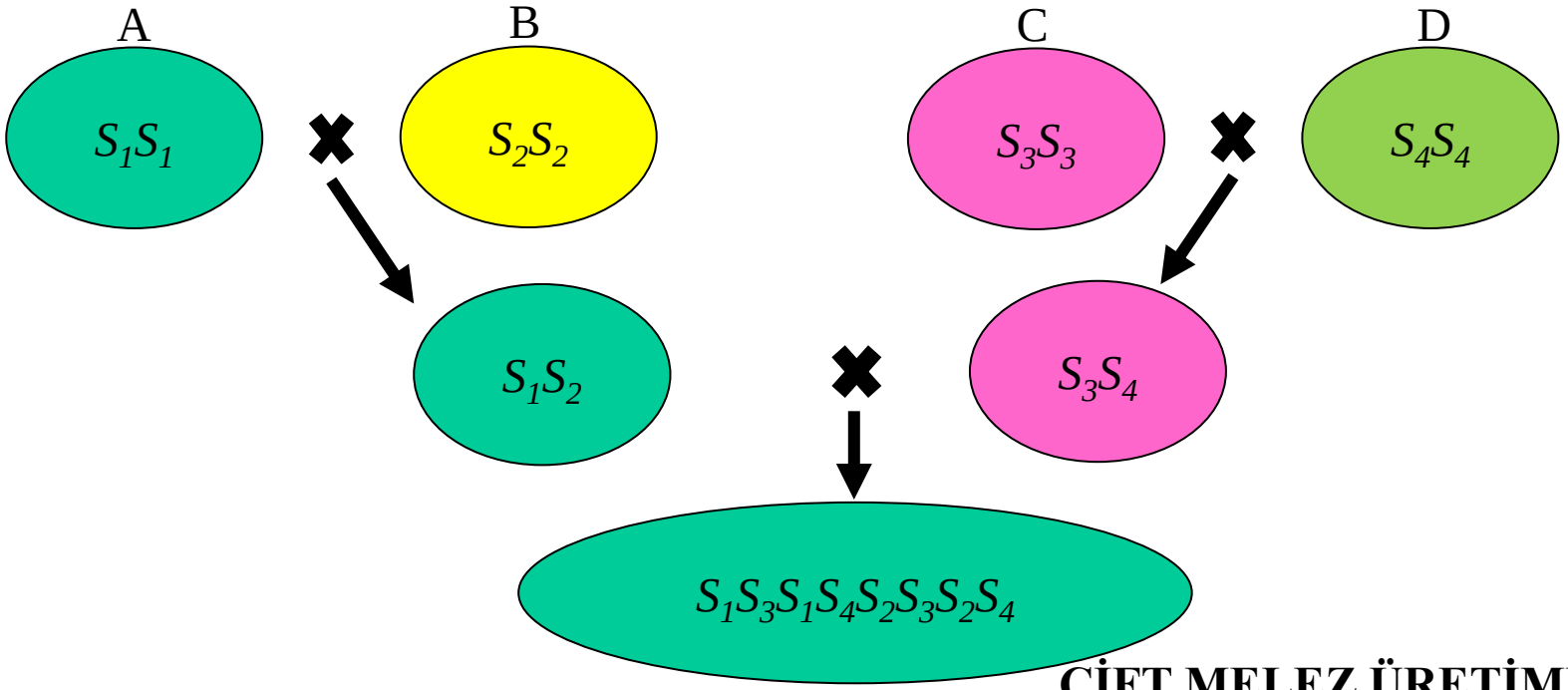
Kendine Uyuşmazlığa Dayalı Hibrit Tohum Üretimi

- Kendine uyuşmazlık (SI), heteromorfik ve homomorfik olmak üzere iki türlüdür.
- Heteromorfik SI: Çiçeklerinde yapısal olarak farklı üreme organları bulunduran bazı erselik türlerde görülür [Uzun stamen-kısa dişicik borusu (Thrum) veya uzun dişicik borusu- kısa stamen (Pın)].
- Homomorfik SI: Bu uyuşmazlıkta tek bir S lokusunda bulunan bir seri allel gen tarafından (*S1*, *S2*, …….*Sn*) polen:stigma etkileşimi ile ortaya çıkar.
- Gametofitik SI ve Sporofitik SI olmak üzere iki tür kendine uyuşmazlık vardır.
  - S_1S_2 xS_1S_2→ Kısır S_1S_2 x S_1S_3 → Fertil (S_1S_3 ve S_1S_2)
- Sporofitik uyuşmazlıkta *S*-lokus Reseptör Kinaz **(SRK)** ve *S*-lokus Cystein Rich Protein **(SCR)** gibi bazı enzimler antesisten hemen önce stigmayı kaplayarak uyuşmazlığa sebep olabilmektedir.
- Stigmada **SRK** ve **SCR** gibi enzimler engel oluşturmadan önce yapılacak tozlama ile kendileme yapılabilir (Tomurcuk tozlaması).
- Tomurcuk tozlamasına alternatif olarak **32 °C** ile **62 °C** arasında ışıl işlem uygulamasıdır. Isıl işlem uygulamasını takip eden ilk **iki gün boyunca SI mekanizmasının** çalışmadığı görülmüştür.
- **% 3-5 CO_2 uygulamasından** da olumlu sonuçlar alınmıştır.
- Uyuşur polenler ile uyuşmaz polenlerin karıştırıldığında **(mentor etkisi)** da SI kırılabilmektedir.
- S Lokus genlerinin ifade olunmasında epigenetik değişikliklerden kaynaklı SI kırılması ile ilgili bulgular dikkate değerdir.

Kendine Uyuşmazlık Sistemi ile Tek ve Çift Melez Tohum Üretimi



TEK MELEZ ÜRETİMİ

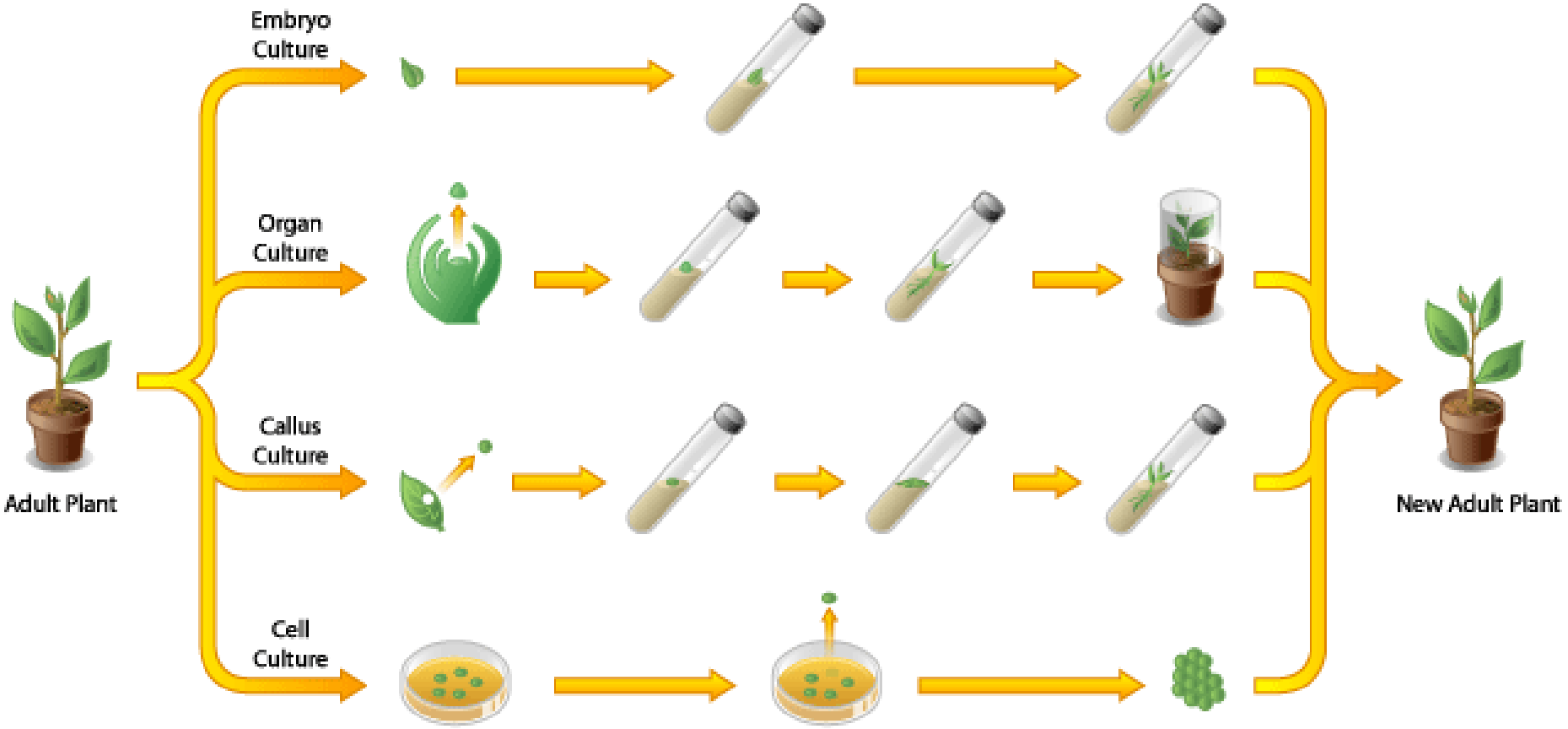


ÇİFT MELEZ ÜRETİMİ

Biyoteknoloji Destekli Islah Yöntemleri

- Doku kültürü yöntemleri
- Embriyo kültürü
- Kallus ve embriyogenesis
- Protoplast kültürü veya füzyonu
- Anter ve/ veya ovül ovryum kültürü
- Marker destekli seleksiyon (MAS)
- Rekombinant DNA teknolojisi
- Haploidi yöntemi

Doku Kültürü



Doku Kültürü

- Bitki doku kültürü; bir dizi *in vitro* teknik, yöntem ve bitki biyoteknolojisinin parçası olan stratejiler içerir.
- Doku kültürü, genetik çeşitlilik oluşturmak, bitki sağlığını iyileştirmek ve istenen genetik materyali oluşturmak için kullanılmıştır.
- Doku kültürü, gen transferi yoluyla belirli özellikleri dahil etmek için başarıyla kullanılan moleküler tekniklerle birleştirilir.
- Protoplast, anter, mikrospor, ovül/ovaryum ve embriyo kültürleri ile yeni çeşitlilikler oluşturulmasına imkan sağlar.
- Hücre kültürü ile yeni ürün geliştirme potansiyeli olan somaklonal ve gametoklonal çeşitlilik oluşturulmasına imkan sağlar
- Tek hücre ve meristem kültürleri ile hastalıklardan ari bitkiler geliştirilmesine imkan sağlar.

Doku Kültürünün Bitki Geliştirme ve Farklı Uygulama Alanları

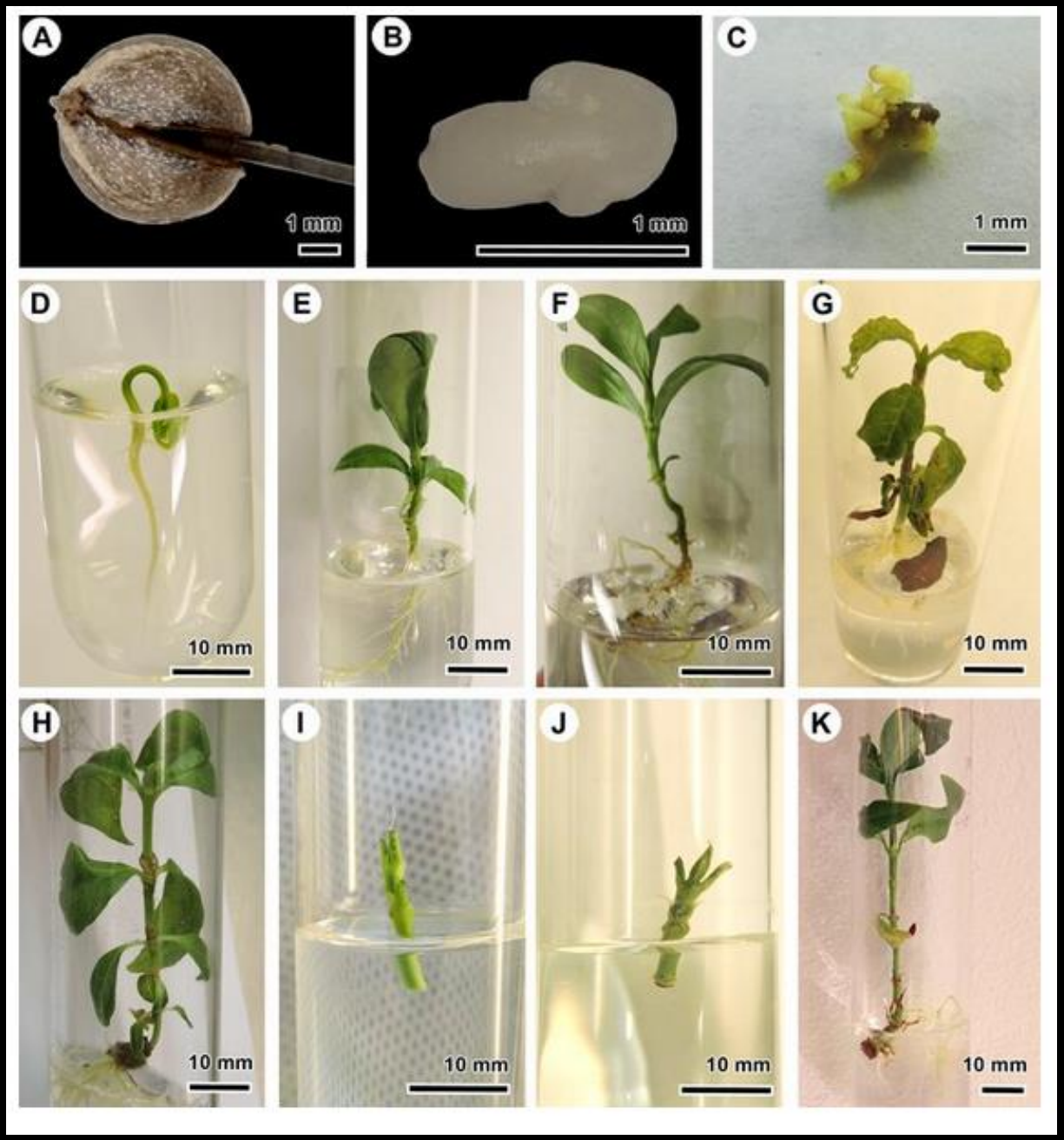
- Yetiştirme ve biyoteknoloji
- Uzak melezlerde kullanım
- Haploidler/dihaploid
- Somaklonal varyasyon
- Potoplast füzyonu
- Mikro çoğaltım
- Sentetik tohum üretimi
- Patojenlerden temizleme
- Genetik kaynakların korunması …

Uzak Melezleme

- Uzak akraba melezlemelerinde döllenme süreci herhangi bir aşamada engellenebilir, bu da melezleme ile iki genotip arasındaki gen transferinin engellenmesiyle sonuçlanır.
- İki tip engel vardır
  - Pre-zigotik engeller
  - Post-zigotik engeller
- Bu sorunların üstesinden gelmek için aşağıdaki prosedürler takip edilir.
  - *İn vitro* fertilizasyon
  - Embryo kültürü
  - Protoplast füzyonu

Embriyo Kültürü

- Olgun veya olgunlaşmamış embriyoların kültüre alınması ile bitki elde edilmesidir.
  - Tohum dormansisi kolaylıkla giderilebilir.
  - İki tip embriyo kültürü vardır
    - Olgun embriyo kültürü
    - Olgunlaşmamış embriyo kültürü (embriyo kurtarma)
- Olgun embriyo kültürü
- Embriyolar olgun tohumlardan izole edilir ve *in vitro* koşullarda kültüre alınır. Uygulama koşulları;
  - Embriyolar uzun süre dinlenmede kaldığında,
  - Embriyoların *in vivo*'da canlılığının düşük olması,
  - Tohum çimlenmesinin engellenmesini önlemde,
  - Steril tohumları yaşayabilir fidelere dönüştürmede



Embriyo ve Sürgün Ucu Kültürü

(A-H) Embriyo kültürü

(A) Embriyonun kesilerek çıkartılması

(B) İzole edilmiş embriyo

(C) Orijinal embriyo üzerinde oluşan adventif embriyolar

(D) İki haftalık fide

(E) Üç aylık bitkicik

(F) 2.5 yıllık sürgün

(G) Üç aylık bitki

(H) 2.5 yıllık bitkiden alınmış sürgün

(I) Kültüre alınmış sürgün ucu

(J) İki haftalık çelik

(K) Sürgün ucundan üretilmiş 8 aylık bitkicik.

Embriyo Kurtarma

- Olgunlaşmamış embriyoları veya çimlenme yeteneği olamayan tohumların *in virto* koşullarda bitkiye dönüştürülmesidir.
- Embriyo kültürünün uygulanma alanları;
- Embriyo aborsiyonunun önlenmesi
- Tohum dormansisini kırmak
- Üreme döngüsünün kısaltılması
- Haploid üretimi (uzak melez ve ışınlanmış polen tk. vs)

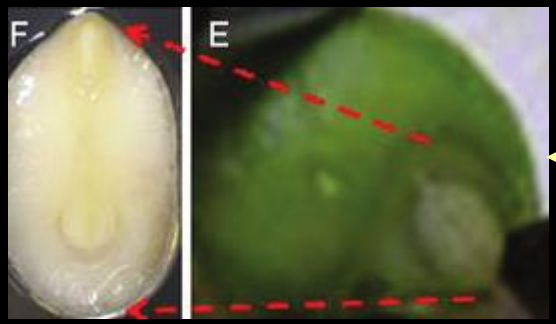
Embriyo Kurtarma

Olgunlaşmamış embriyolar

Sterilizasyon

Sterilize edilmiş tohumlar

Embriyoların izolasyonu



Embriyoların kültüre alınması

Embriyoların büyümesi

Gelişmiş bitkiler

Dış ortama aktarılabilecek bitkiler

Toprağa aktarılmış bitkiler

A1
A2
B1
B2
C1
C2
D1
D2
E1
E2
E3

Haploid (Dihaploid Üretimi)

- Androgenesis
  - Anter kültürü
  - Mikrospor kültürü
- Gynogenesis
  - Ovül kültürü
  - Ovaryum kültürü
  - Embriyo kurtarma

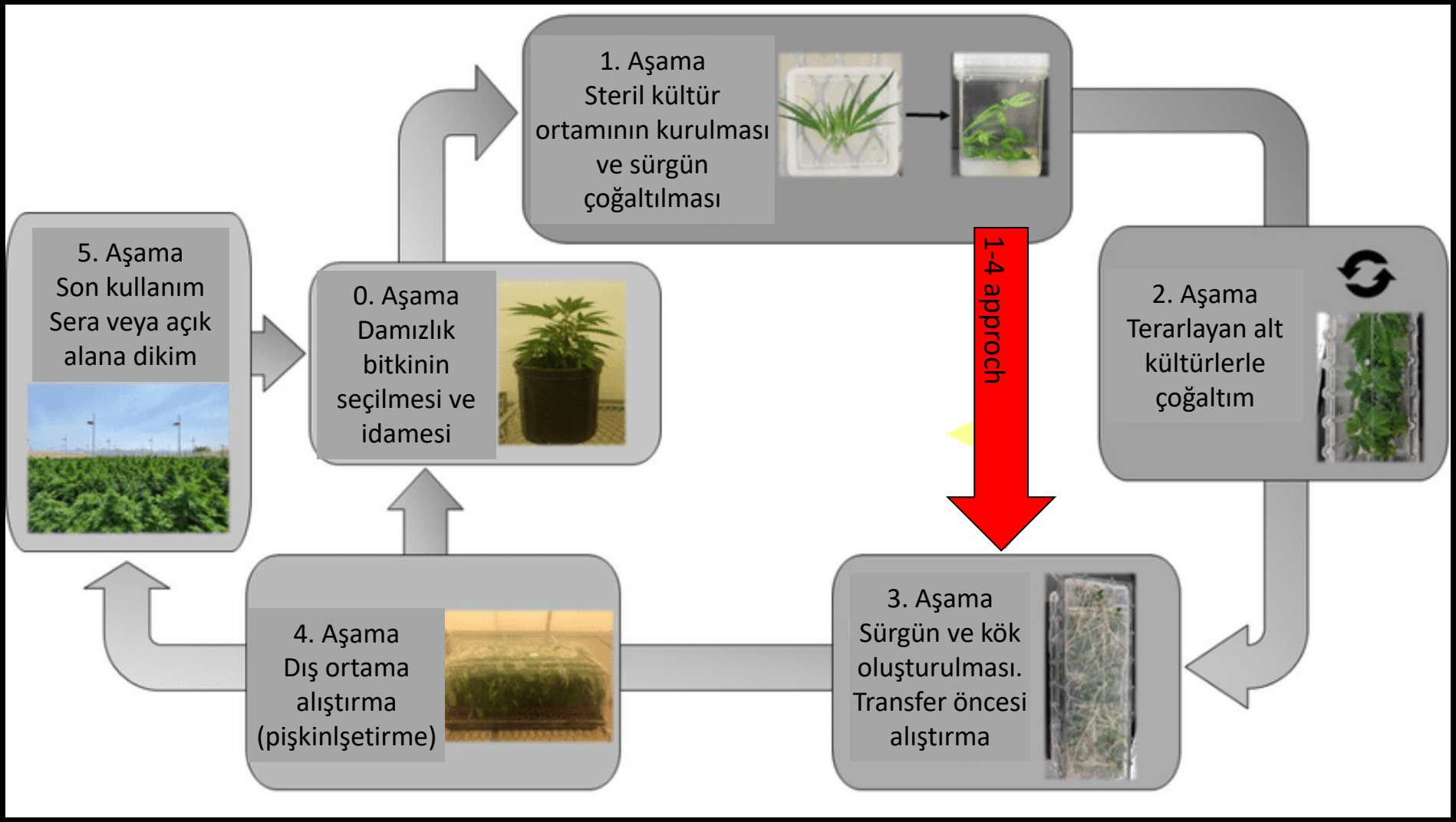
Mikro Çoğaltım

- Doku kültürü yoluyla *in vitro* klonal çoğaltma yöntemidir.
- Mikro çoğaltma tekniği, geleneksel eşeysiz çoğaltmaya tercih edilir (*hücre, kallus, meristem*…).
  - Az miktarda dokuya ihtiyaç vardır
  - Dar alanlarda çok sayıda bitki üretilebilir.
  - Dış koşullardan bağımsızdır
  - Sürekli üretim yapılabilir
  - Steril (sağlıklı; hastalıklardan ari) bitkilerin üretilmesi
  - Bitki materyallerinin uluslararası değişiminin kolaylaşması
  - Taşıma imkanının oluşması ve maliyetin düşmesi

Mikro çoğaltmanın ana aşamaları

1. Ana bitkinin seçimi, bakımı ve idamesi
2. Kültürün başlatılması ve kurulması
3. Sürgünlerin çoğalması veya hızlı somatik embriyo oluşumu
4. Somatik embriyoların *in vitro* çimlenmesi ve / veya sürgünlerin köklenmesi
5. Bitkilerin sera ve dış koşullara alıştırılması

Mikro çoğaltımın aşamaları



Mikro Çoğaltım

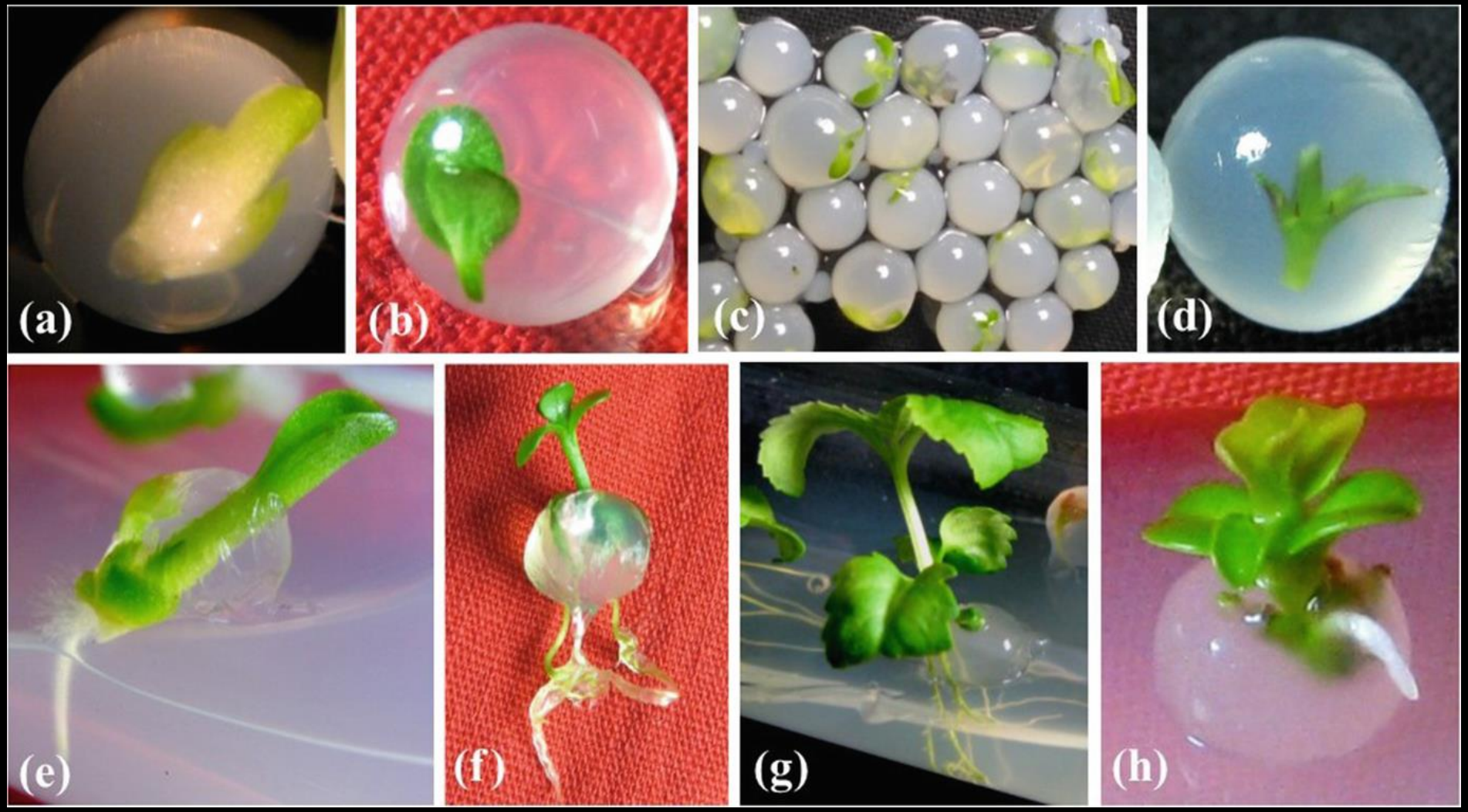
- **Avantajları**
  - Yüksek oranda bitki çoğaltımı
  - Zaman kısıtlamasının az olması
  - Hastalıksız bitki üretimi
  - Bazı türlerde tohum/tohumluk üretimi
  - Uygun maliyetli süreç
  - Otomatik mikro çoğaltmaya uygunluk

- **Dezavantajları**
  - Yüksek başlangıç maliyeti
  - Kontaminasyon riski
  - Bilimsel altyapı ve insan kaynağı
  - Genetik değişkenlik
  - Vitrifikasyon
  - Teknik altyapı sorularından dolayı yaşanabilecek riskler

Sentetik Tohum

- *İn vitro* koşullarda kaplanmış somatik embriyolar sentetik tohum olarak adlandırılır.
- Sentetik tohum türleri
  - Bir su jeli içinde kaplanmış somatik embiyolar
  - Kurutulmuş ve kaplanmış somatik embriyolar
  - Kurutulmuş ve kaplanmamış somatik embriyolar
  - Sıvı taşıyıcı içine alınmış somatik embriyolar
  - Bir su jeli içinde kapsüllenmiş tomurcuklar

Genellikle, kapsülleme için **Na veya Ca aljinat** seçilir. Çünkü embriyolar için daha az toksiktir ve kullanımı kolaydır


(a)
(b)
(c)
(d)
(e)
(f)
(g)
(h)

Genetik Kaynakların Koruması

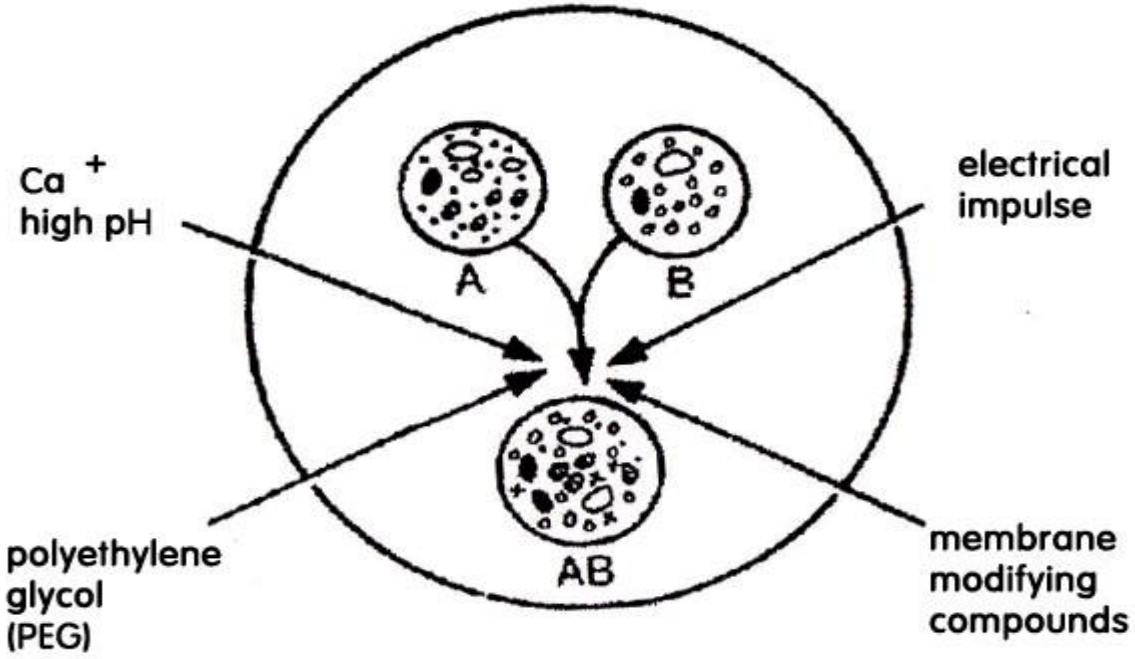
- Sürgünler, meristemler ve embriyolar *in vitro* yöntemler ile korumaya uygundur.
- Üç ana yaklaşım
  - Kriyoprezervasyon
  - Soğukta saklama
  - Düşük basınç ve düşük oksijende saklama

Protoplast Füzyonu

- Klasik yolla melezlenemeyen bitkilerde protoplastların füzyonu yolu ile somatik melezlerin oluşturulmasıdır.
- İki bitkinin protoplastları kimyasal veya fiziksel yöntemlerle füzyon yapılabilir.
- Protoplast füzyonun uygulama alanları
  - Hastalık ve zararlılara direnç
  - Çevresel streslere direnç
  - Verim artışı
  - Kalite artışı
  - Sitoplazmik erkek kısırlığı

Somatik hücre melezlemesi (protoplast füzyonu):

Protoplast füzyonu ve somatik melezleme, uyuşmazlıklar nedeniyle, **klasik melezleme ile elde edilemeyen hibritlerin** elde edilmesinde **kimyasal ve fiziksel** metotlar kullanılarak uygulanan bir tekniktir.
Elde edilen somatik melez hücreden, kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu yoluyla yeni bitkilerin elde edilmesi sistemin en önemli ve en gerekli parçasıdır.



https://www.youtube.com/watch?v=utlKKvqxbWw

Somatik Melezleme Tekniği

1. Protoplast izolasyonu

↓

2. Protoplastların füzyonu

↓

3. Somatik melezlerin tanımlanması

↓

4. Melez hücrelerin kültürü

↓

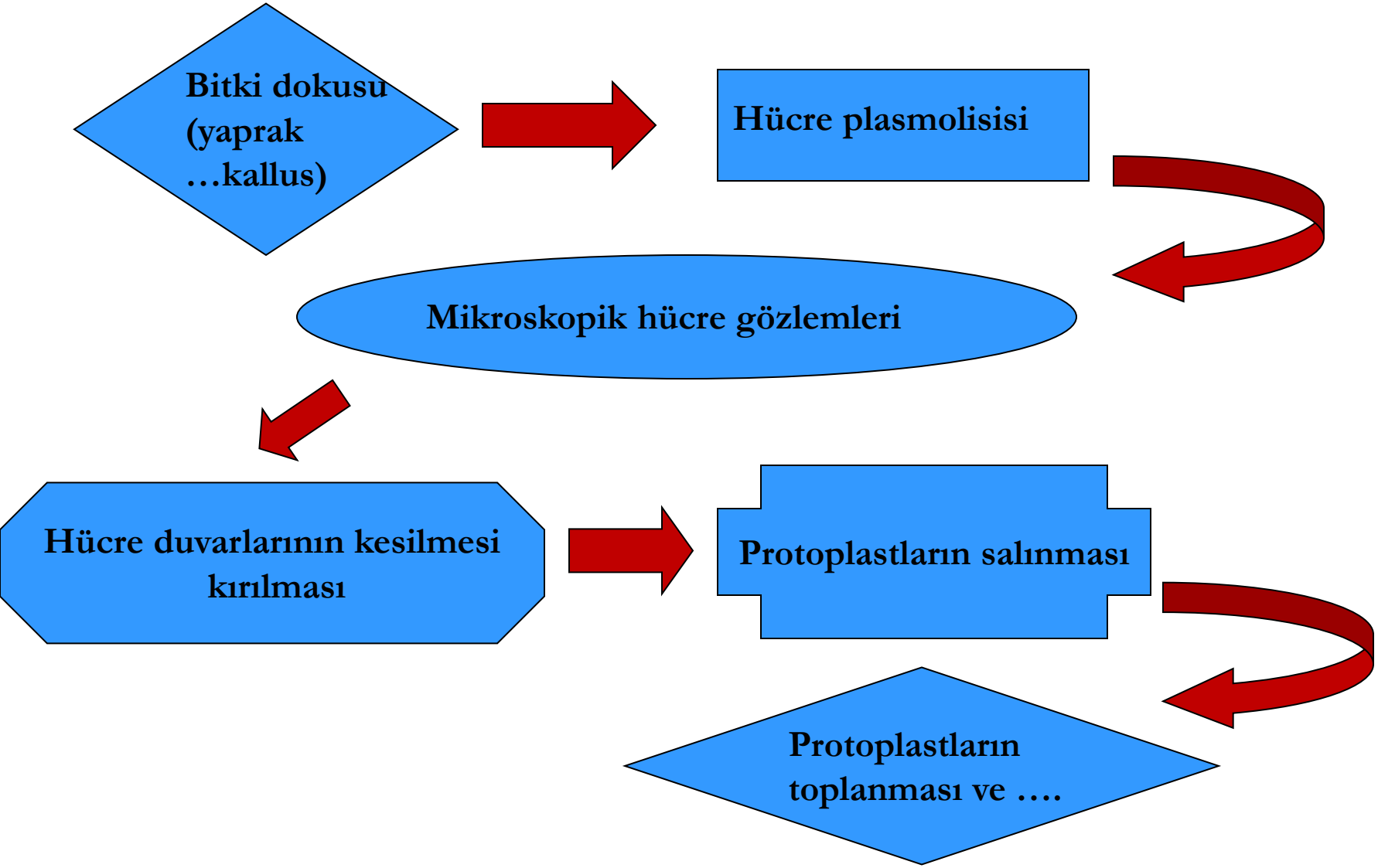
5. Somatik melez bitkilerin yetiştirilmesi

Protoplast izolasyonu
(protoplastların bitki dokularından ayrılması)

1. Mekanik yöntem

2. Enzimatik yöntem

Mekanik Yöntem



Enzimatik Metot

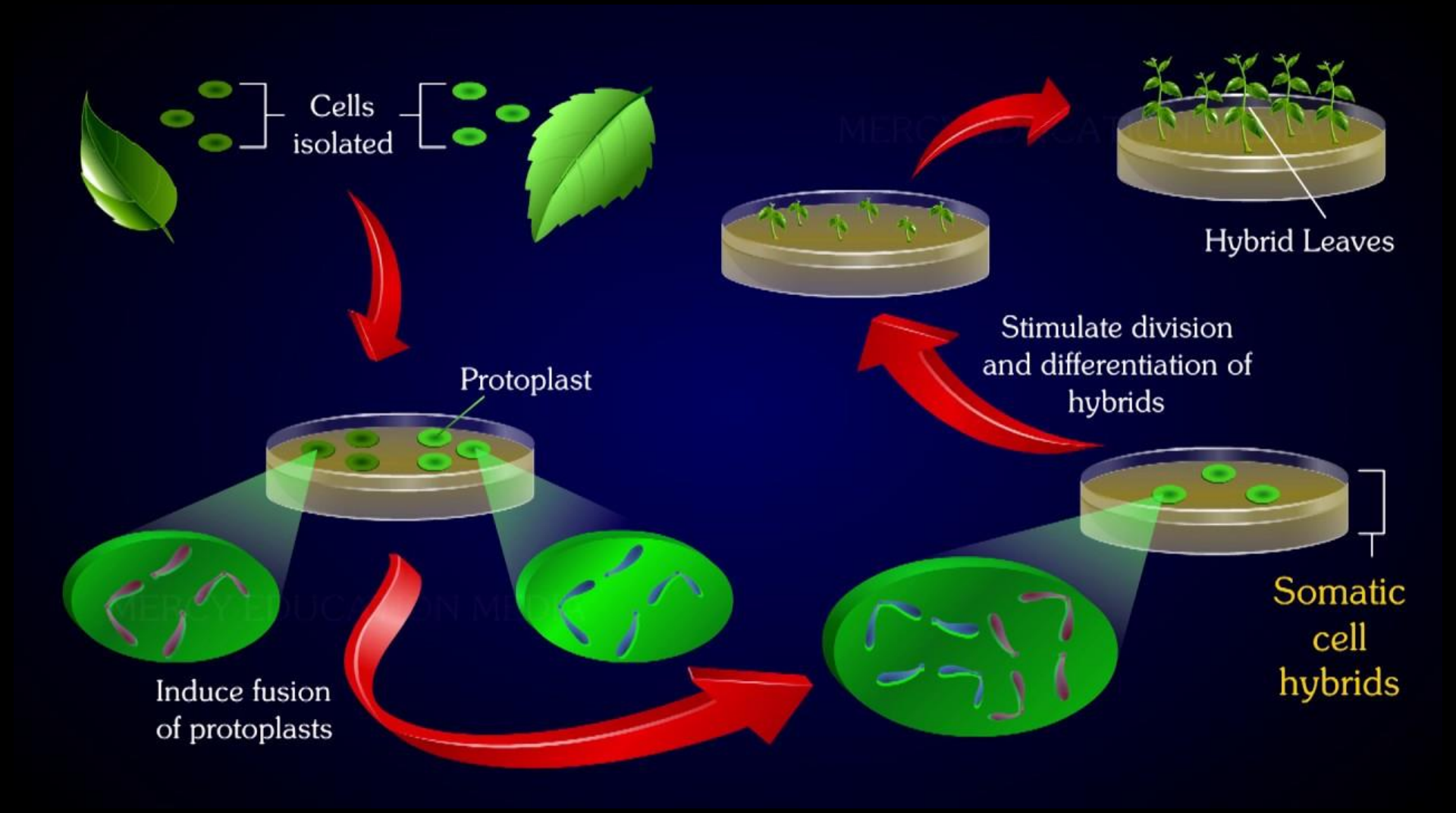
Protoplast Füzyonu
(İki farklı genotipin protoplastlarının füzyonu)

1. Spontan Füzyon

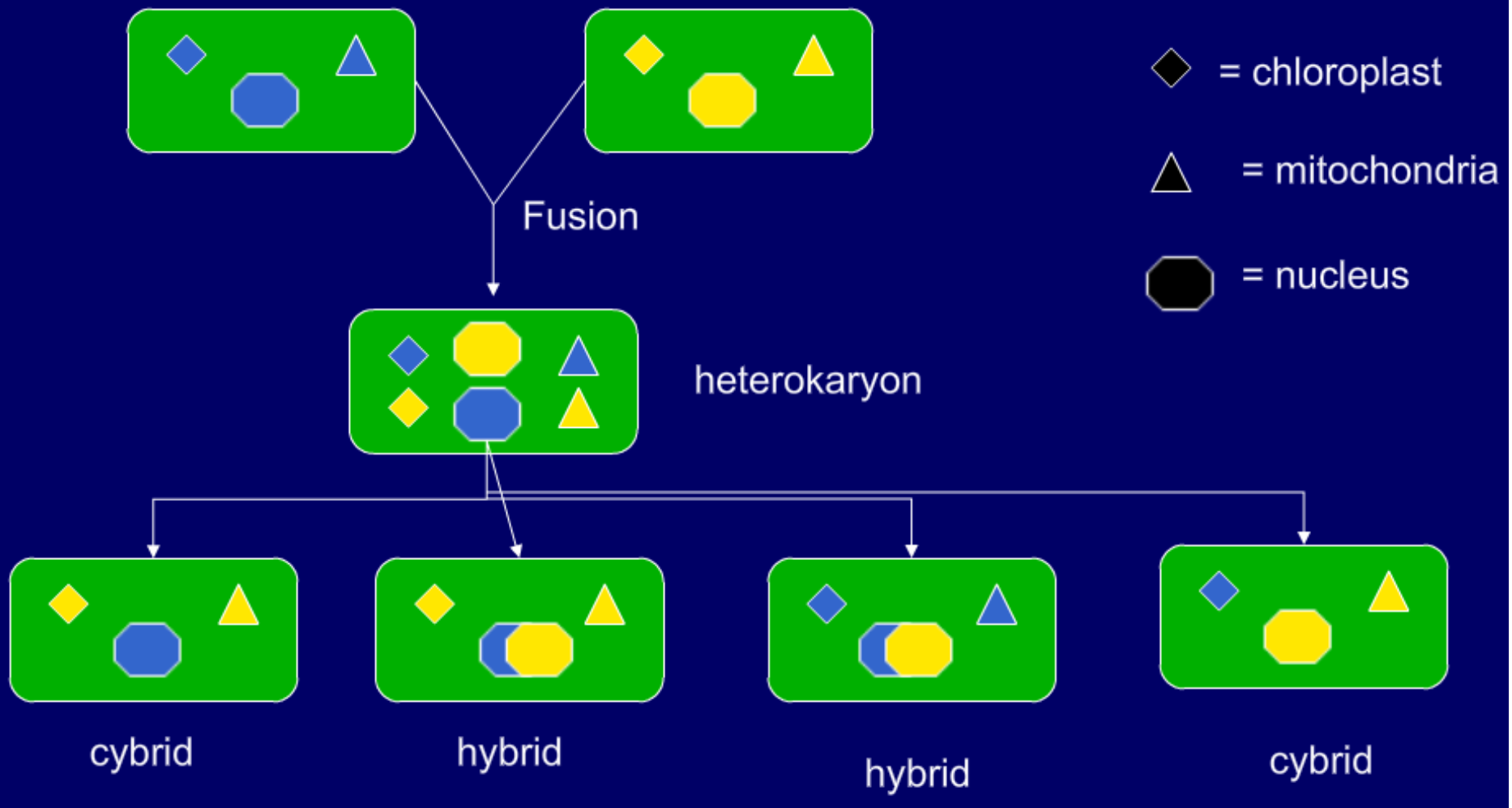
- **Tür içi**
- **Türler arası**

2. Uyartılmış füzyon

- **Kimyasal füzyon**
- **Mekanik füzyon**
- **Elektrofüzyon**


Cells
isolated
Protoplast
Induce fusion
of protoplasts
Somatic
cell
hybrids
Stimulate division
and differentiation of
hybrids
Hybrid Leaves

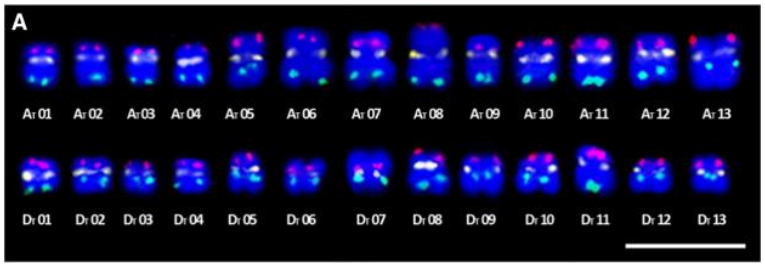
Possible Result of Fusion of Two Genetically Different Protoplasts

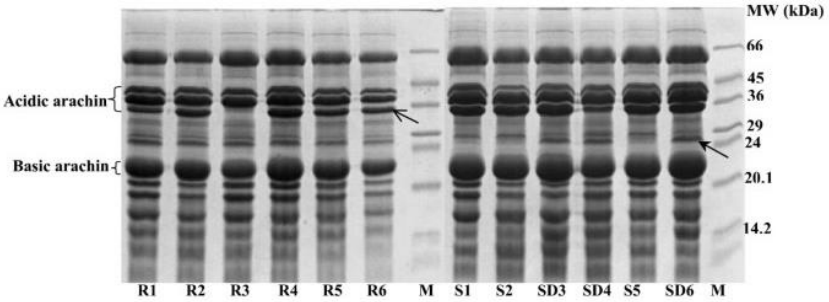


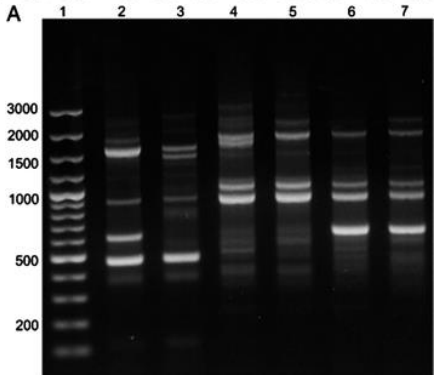
Marker Destekli Seleksiyon (MAS)

Markerlar

- Morflojik markerlar
- Sitolojik markerlar
  - Kromozomların boyutunda, pozisyonunda ve bandlama düzenlerinde mevcut olan varyasyonlar ilişkili olan markerlardır.
- Biyokimyasl markerlar
  - İzozimler
  - Proteinler
  - Sekonder metabolitler
- DNA markerları
  - DNA hibridizasyonuna bağlı markerlar
    - RFLP
  - PCR'a dayanan markerlar
    - RAPD
    - AFLP
    - SSR ve ISSR
    - STS ve SNP
    - ETS
    - SRAP
- Yeni nesil dizileme sitemlerinin (NGS) geliştirilmesi ile PCR aşamasına gerek kalamadan tanımlama da yapılabilmektedir.

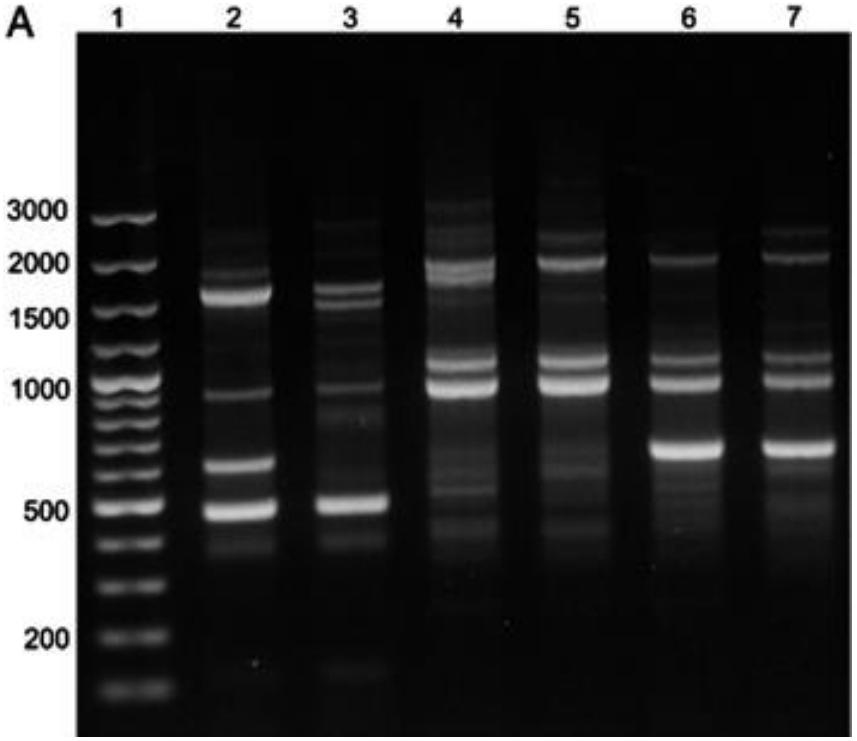




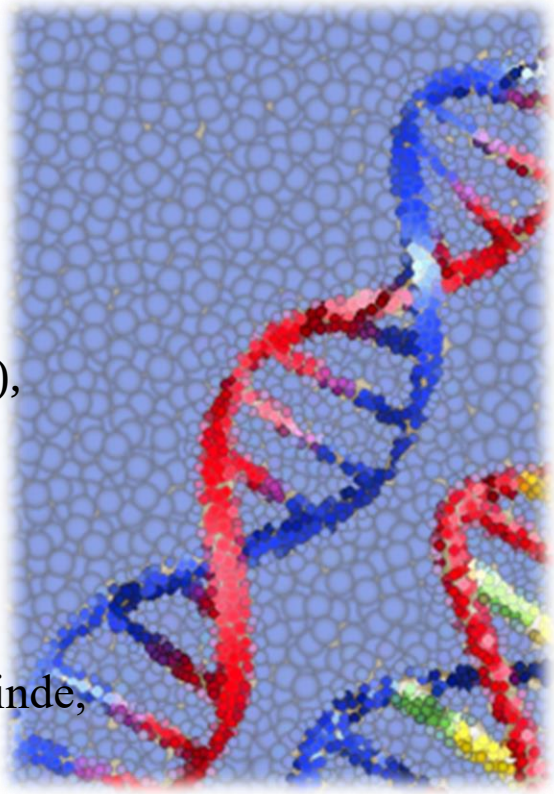


Marker Destekli Seleksiyon (MAS)

- Moleküler markerlardan (özellikle DNA) faydalanılarak hem kalitatif, hem de kantitatif karakterlerin (QLT) çevreden etkilenmeksizin hızlı ve güvenilir bir şekilde seleksiyonuna MAS denir.
- MAS'ta seleksiyon hızlı ve maliyet düşüktür.
- MAS'ın başarısı ilgili genle (karakterle) markerın arasındaki ilişkiye bağlıdır.
- Çevre koşullarından ve zamandan bağımsız olarak seleksiyonlar yapılabilir.
- Hastalık dayanıklılığında biyolojik testlere gerek kalmadan seleksiyon yapılabilir ya da birey sayısı azaltılabilir.
- Fenotip kolaylıkla tanımlanamıyorsa veya geç çıkıyor ise MAS büyük avantaj sağlar.
- Moleküler markerlar ile akrabalık düzeyleri belirlenebilmekte, genetik haritalar yapılabilmektedir.
- F_1 ıslahında heterotik gruplar belirlenebilmektedir.
- MAS ile melezleme ıslahında döllerin gerçek melez olup olmadığı kolaylıkla tespit edilebilir.



Marker Destekli Seleksiyon (MAS)



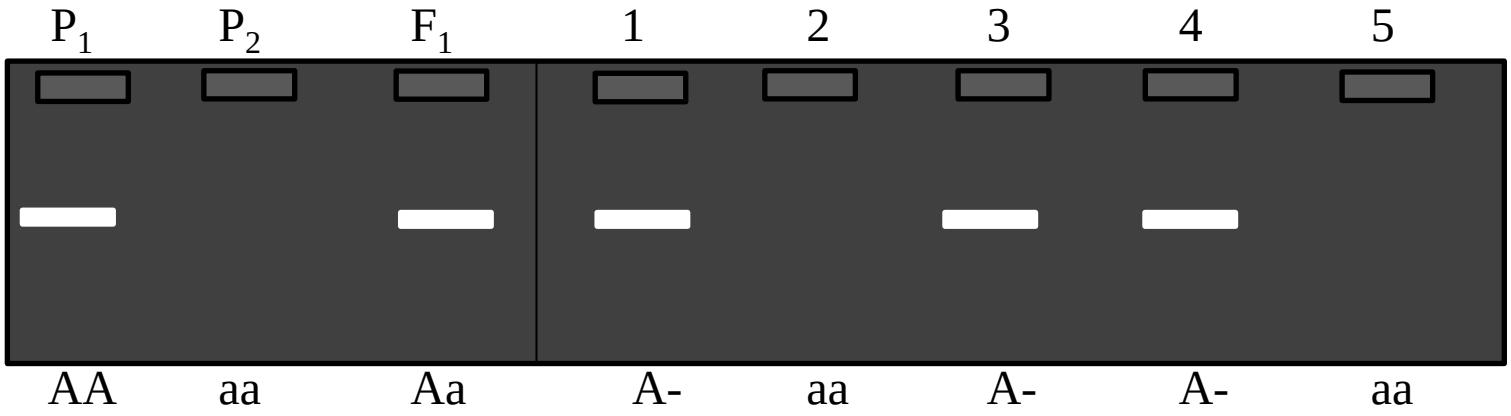
Moleküler makerlar;

- Genetik çeşitliliğin saptanmasında,
- Akrabalık ilişkilerinin tespitinde,
- Ebeveyn ve F_1 melezlerin seçiminde,
- Homojenite testlerinde (homozigot ve heterozigot bireyler),
- Hedef geni veya alleli taşıyan bireyin belirlenmesinde,
- Gen piramitlerinin oluşturulmasında,
- Erken generasyon döl testlerinde,
- Döl testine gerek kalmadan hedef fenotiplerin belirlenmesinde,
- CMS, İdameci ve Restorer hatların geliştirilmesinde,
- Ebeveynlerin, aday çeşitlerin ve ticari çeşitlerin parmak izlerinin çıkartılmasında,
- Mutant ve transgenik bitkilerin analizinde,
- MAS ve QTL analizlerinde kullanılmaktadır.

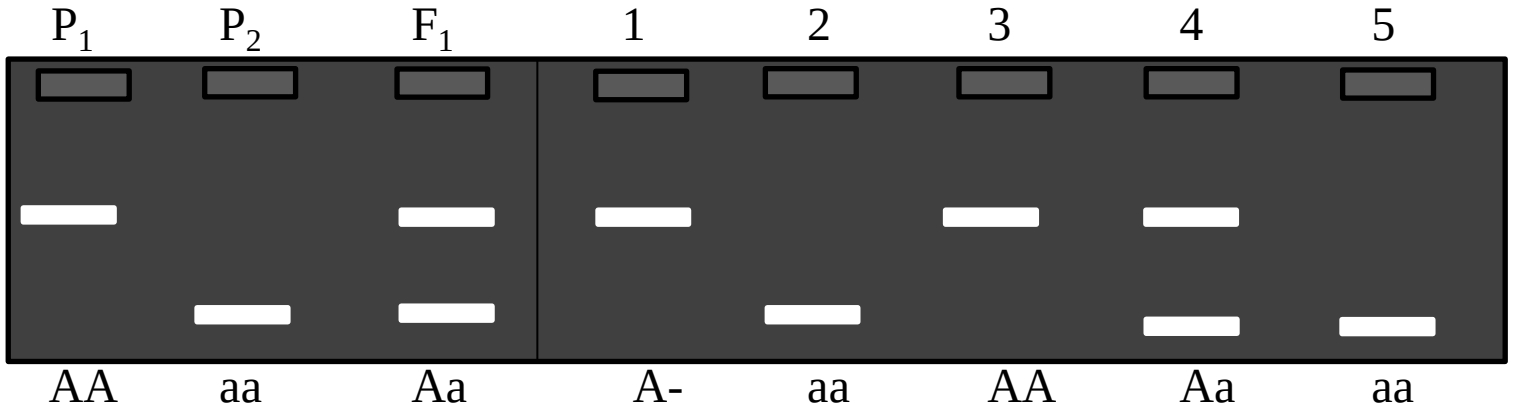
Markerlar

- Genotipler arasından farklılık göstermeyen markerlara monomorfik markerlar, farklılık gösterenlere ise polimorfik markerlar denir.
- Moleküler markerlar dominant ve ko-dominat olmak üzere ikiye ayrılır.
- Dominant marker heterozigot bireyi (*Aa*) ayıramazken ko-dominant marker heterozigot bireyi de ayırabilir.

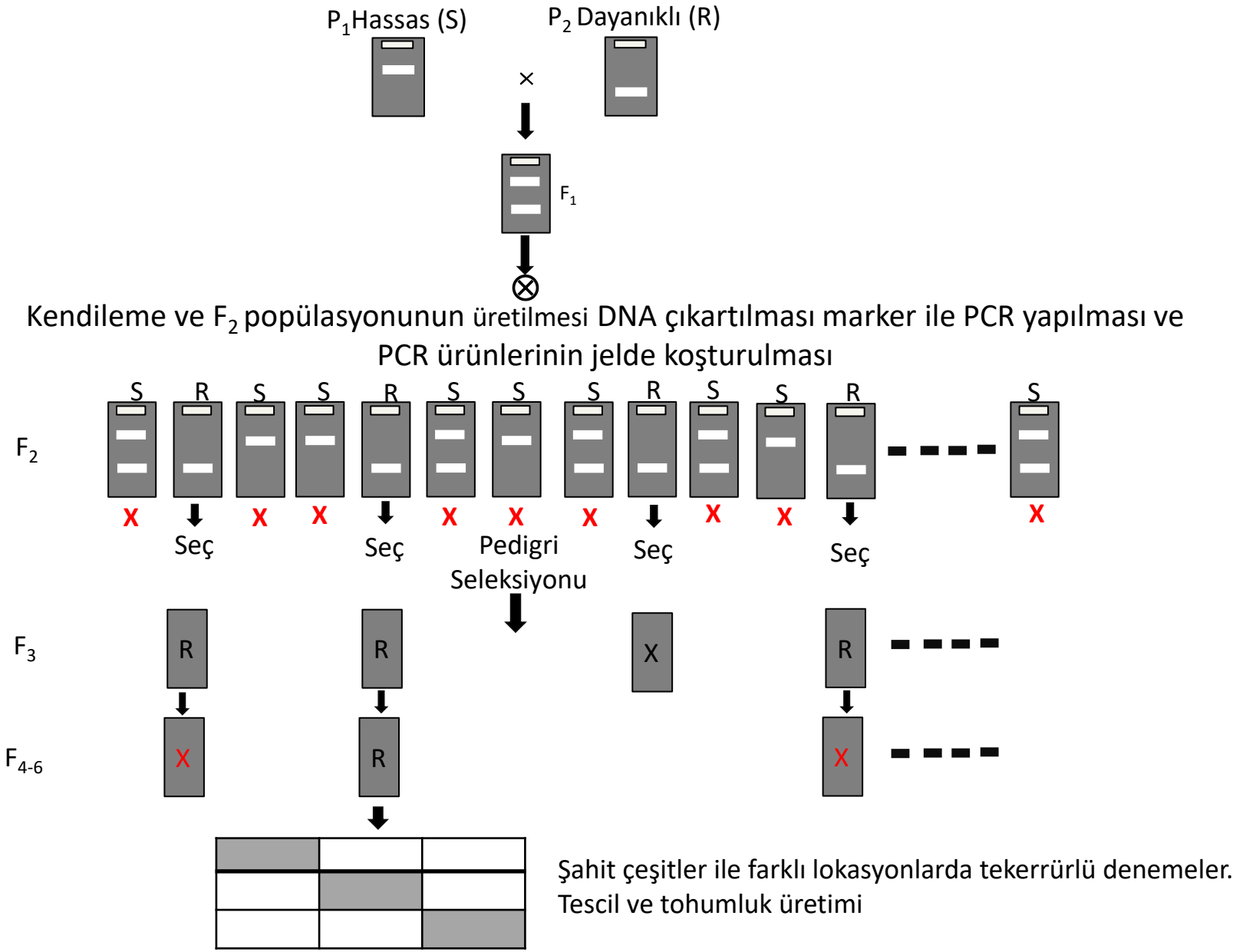
Dominant Marker



Co-dominant Marker



Melezleme Islahında MAS Yardımıyla Çeşit Geliştirme



- https://www.youtube.com/watch?v=C1Riedng9WY

- https://www.youtube.com/watch?v=C1Riedng9WY
- https://www.youtube.com/watch?v=CN6ByQkO1sA

GREEN REVOLUTION
IS THE BEST SOLUTION
TO ARREST POLLUTION
– Aniket Kabra