

**ÇAVDARDA (*Secale cereale* L.) ANTER KÜLTÜRÜNDE PLOİDİ, ÖN İŞLEM
VE BESİ ORTAMI İÇERİĞİNİN ETKİSİ**

Nüket ALTINDAL

Yüksek Lisans Tezi

TARLA BİTKİLERİ ANA BİLİM DALI

ISPARTA-2005

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇAVDARDA (*Secale cereale* L.) ANTER KÜLTÜRÜNDE PLOİDİ, ÖN İŞLEM
VE BESİ ORTAMI İÇERİĞİNİN ETKİSİ

NÜKET ALTINDAL

YÜKSEK LİSANS TEZİ
TARLA BİTKİLERİ ANA BİLİM DALI
ISPARTA-2005

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|--|--------------|
| İÇİNDEKİLER..... | i |
| ÖZET..... | ii |
| ABSTRACT..... | iii |
| TEŞEKKÜR..... | iv |
| SİMGELER DİZİNİ..... | v |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | vi |
| ÇİZELGELER DİZİNİ..... | viii |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 2. KAYNAK ÖZETLERİ..... | 4 |
| 3. MATERYAL VE METOT..... | 17 |
| 3.1. Materyal..... | 17 |
| 3.2. Metot..... | 17 |
| 3.2.1. Denemenin Düzenlenmesi..... | 17 |
| 3.2.2. Besin Ortamının Hazırlanması..... | 17 |
| 3.2.3. Anterlerin Alınması ve Ön İşlem Uygulaması..... | 19 |
| 3.2.4. Anterlerin Sterilizasyonu..... | 20 |
| 3.2.5. Anterlerin Besin Ortamına Alınması..... | 21 |
| 3.2.6. Kültür Koşulları..... | 22 |
| 3.2.7. Araştırmada İncelenen Konular..... | 23 |
| 3.2.8. Verilerin İstatiksel Analizi..... | 23 |
| 4. BULGULAR..... | 24 |
| 4.1. Tepki Gösteren Anter Oranı..... | 24 |
| 4.2. Kallus Oranı..... | 33 |
| 4.3. Kallus Büyüklüğü..... | 42 |
| 4.4. Gelişme Ortamında Kök Oluşumu..... | 50 |
| 5. TARTIŞMA VE SONUÇ..... | 54 |
| 6. KAYNAKLAR..... | 60 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 70 |

ÖZET**ÇAVDARDA (*Secale cereale* L.) ANTER KÜLTÜRÜNDE PLOİDİ, ÖN İŞLEM VE BESİ ORTAMI İÇERİĞİNİN ETKİSİ**

Bu araştırmada, çavdarda anter kültüründe önemli bir problem olan rejenerasyon kapasitesinin farklı uygulamalarla artırılması amaçlanmıştır. Diploid ve tetraploid kültür çavdarına ait anterlerin in-vitro kültüründe, farklı uygulamaların kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonuna etkisi belirlenmeye çalışılmıştır.

Denemede kültür ortamı olarak modifiye edilmiş N₆ ortamı kullanılmıştır. Araştırma tesadüf parsellerinde 20 tekerrürlü faktöriyel deneme desenine göre kurulmuştur. Faktör olarak ön işlem [soğuk uygulanmış (1 hafta +4 °C'de karanlıkta bekletme) ve uygulanmayan], ploidi [diploid ve tetraploid (*Secale cereale* L.)], karbon kaynakları (120 g/l maltoz ve 90 g/l sakaroz) ve hormonlar (2 mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l kinetin ve 1 mg/l IAA) uygulanmıştır.

Tarla şartlarında yetiştirilen çavdar başaklarına ait anterler, bayrak yapraktan kılıçkların görüldüğü dönemde alınmış ve besi ortamlarına ekilmiştir. Örnekler 16 saat aydınlık / 8 saat karanlık olacak şekilde 2000-2200 lux arasında değişen aydınlatma koşullarında 22 °C'de tutulmuştur.

Araştırma sonuçlarına göre varyans analizi, MSTAT-C paket programında yapılmış, anter tepki oranı ve kallus oranına ait yüzdeliklere açılı transformasyonu uygulanmıştır.

Araştırma sonucunda ön işlem uygulamasının anter tepki oranı, kallus oluşumu ve kallus büyüklüğü üzerine önemli etkisi belirlenmiştir. Soğuk uygulaması anter tepki oranı ve kallus büyüklüğünü azaltmış, kallus oranını ise arttırmıştır. Yine, soğuk uygulanmış anterlerden oluşan kalluslarda kök gelişiminin soğuk uygulanmayanlara göre daha fazla olduğu ortaya konulmuştur.

Ploidi seviyesinin anter tepki oranı üzerine istatistiksel olarak önemsiz, kallus oluşumu ve kallus büyüklüğü üzerine ise önemli etkileri belirlenmiştir. Nitekim tetraploidlerde kallus büyüklüğü ve kallus oluşturan anter oranı diploidlerden daha fazla, tepki gösteren anter oranı ise daha düşük bulunmuştur.

Karbon kaynaklarının incelenen üç özellik (anter tepki oranı, kallus oranı ve kallus büyüklüğü) üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuş ve maltoz kullanıldığında kallus oranı ve kallus büyüklüğü artmış, anter tepki oranı ise azalmıştır.

Denemede ele alınan hormonların tepki gösteren anter oranı ve kallus büyüklüğü üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. İncelenen özellikler (anter tepki oranı, kallus oranı ve kallus büyüklüğü) üzerine 2,4-D ve IAA in etkileri benzer olmuş ve aralarında önemli fark tespit edilmemiştir.

İncelenen tüm faktörlerin (ön işlem x ploidi x karbon kaynakları x hormon) birbirleriyle olan etkileşimi istatistiksel olarak önemli olmuştur. Buna göre, araştırmada transforme olmayan değerler dikkate alındığında, tepki gösteren anter oranı % 27.00-97.50, kallus oluşturan anter oranı % 13.00-28.00, kallus büyüklüğü ise 1.03- 6.03 mm arasında değişmiştir.

ANAHTAR KELİMELELER : Çavdar, anter kültürü, kallus, haploid bitki

ABSTRACT**EFFECT OF PLOIDY, PRE-TREATMENT AND CONTENT OF NUTRIENT MEDIA IN ANTHOR CULTURE OF RYE (*Secale cereale* L.)**

The objective of this research is to enhance regeneration capacity which is an important problem for anther culture in rye by applying different treatments. The effect of different treatments on callus induction and plant regeneration in *in vitro* culture of anthers from diploid and tetraploid true ryes was evaluated.

In study, modified N₆ medium used as culturing medium. Study was designed as factorial trial desing of 20 repetition on randomised plots. As factors, pre-treatment [cold treated (incubation at 4 °C for a week in the dark) and non-cold treated], ploidy [diploid and tetraploid (*Secale cereale* L.)], carbon sources (120 g/l maltose and 90 g/l sucrose) and hormones (2 mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l kinetin and 1 mg/l IAA) were treated.

Anthers from rye spikes which were grown in the field were isolated when the spines of the flag leaf appeared and placed onto nutrient media. Patterns were incubated at 22 °C in 16 h / 8 h day/night photoperiod and light conditions which were 2000-2200 lux.

Analysis of variance according to results of research was made using statistically package programme MSTAT-C, for ratio of anther response and callus, percentages were transformed to arcsin \sqrt{P} .

In this study it was determined that the effect pre-treatment was an important factor on anther response ratio, callus induction and callus size. Both anther response ratio and callus size decreased with cold treatment whereas callus ratio increased with cold treatment. Moreover results showed that the root formation at calli formed from anthers which cold treatment were applied was greater than that of non-treatment.

While effect of ploidy level on anther response ratio was found to be statistically non significant and that of callus formation and callus size was statistically significant. Likewise, callus size and anther ratio forming callus in tetraploids were higher than that of diploids, but anther response ratio in diploids was lower than that of in tetraploids

Effect of carbon sources on three characteristics (anther response ratio, callus ratio and callus size) examined was statistically significant and callus ratio and callus size increased when maltose was used as carbon source, but anther response ratio decreased.

It was found that use of hormones were statistically significant on anther response ratio and callus size. Effects of 2,4-D and IAA were similar for characteristics (anther response ratio, callus ratio and callus size) examined in this study and there was no significant differences between hormones used.

Interaction of all factors (pre-treatment x ploidy level x carbon sources x hormones) examined in this study was statistically significant. According to this, when non-transformed data were evaluated it was found in this research that the ratio of anther response, anthers forming callus, and the size of callus were 27.00-97.50 %, 13.00-28.00 % and 1.03-6.03 mm., respectively.

KEY WORDS: Rye, anther culture, callus, haploid plant

TEŞEKKÜR

Beni bu konuya yönlendiren ve büyük yardımlarını gördüğüm danışman hocam Prof. Dr. İlknur AKGÜN'e ve Tarla Bitkileri Bölüm Başkanı Prof. Dr. Tahsin KARADOĞAN'a ayrıca değerli bölüm hocalarıma ve bu araştırmayı maddi olarak destekleyip, gerçekleşmesini sağlayan Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Fonu yönetici ve ilgililerine teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımın analizinde yardımlarını gördüğüm SDÜ Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümün'den Yrd. Doç. Dr. Sedat AKTAN ve Yrd. Doç. Dr.Yalçın BOZKURT'a, ayrıca tezde emeği geçen tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ayrıca bu güne kadar maddi ve manevi yönden desteklerini gördüğüm sevgili aileme teşekkür ederim.

Nüket ALTINDAL

Isparta, 2005

SİMGELER DİZİNİ

| | |
|-------|-----------------------------------|
| ABA | :Absisik asit |
| BA | :Benzin Adenin |
| BAP | :Benzil amino purin |
| IAA | : Indol asetik asit |
| IBA | : Indol butirik asit |
| 2,4-D | : 2,4–Dikloro fenoksi asetik asit |
| LS-3 | : Linsmaier ve Skoog |
| NAA | : Naftalin asetik asit |
| NN | : Nitsch ve Nitsch |
| MS | : Murashige ve Skoog |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | Sayfa |
|---|--------------|
| Şekil 3.2.3.1. Mikrospor gelişme evreleri | 20 |
| Şekil 3.2.3.2. Diploid çavdarın başak dönemleri. | 20 |
| Şekil 3.2.3.3. Tetraploid çavdarın başak dönemleri..... | 20 |
| Şekil 3.2.5.1. Anterlerin dikim aşamasında çıkarılması..... | 21 |
| Şekil 3.2.5.2. Steril kabinde alt kültüre alma işlemleri..... | 22 |
| Şekil 3.2.6.1. Gelişme odasının genel görünüşü..... | 23 |
| Şekil 4.1.1. Kültür ortamında anterlerin gelişimi..... | 24 |
| Şekil 4.1.2. Anter tepki oranına ön işlemin etkisi..... | 26 |
| Şekil 4.1.3. Anter tepki oranına ploidin etkisi..... | 27 |
| Şekil 4.1.4. Anter tepki oranına karbon kaynaklarının etkisi..... | 27 |
| Şekil 4.1.5. Anter tepki oranına hormonların etkisi..... | 28 |
| Şekil 4.1.6. Anter tepki oranına ön işlem x ploidi interaksyonunun etkisi..... | 29 |
| Şekil 4.1.7. Anter tepki oranına ön işlem x karbon kaynakları interaksyonunun etkisi..... | 29 |
| Şekil 4.1.8. Anter tepki oranına ön işlem x hormon interaksyonunun etkisi..... | 30 |
| Şekil4.1.9. Anter tepki oranına ploidi x karbon kaynakları interaksyonunun etkisi..... | 30 |
| Şekil 4.1.10. Anter tepki oranına ploidi x hormon interaksyonunun etkisi .. | 31 |
| Şekil4.1.11. Anter tepki oranına karbon kaynakları x hormon interaksyonunun etkisi..... | 31 |
| Şekil 4.2.1. Kallus oranına ön işlemin etkisi..... | 36 |
| Şekil 4.2.2. Kallus oranına ploidin etkisi..... | 36 |
| Şekil 4.2.3. Kallus oranına karbon kaynaklarının etkisi..... | 37 |
| Şekil 4.2.4. Kallus oranına hormonların etkisi..... | 37 |
| Şekil 4.2.5. Kallus oranına ön işlem x ploidi interaksyonunun etkisi..... | 38 |
| Şekil4.2.6. Kallus oranına ön işlem x karbon kaynakları interaksyonunun etkisi..... | 38 |
| Şekil 4.2.7. Kallus oranına ön işlem x hormon interaksyonunun etkisi..... | 39 |

| | |
|--|----|
| Şekil 4.2.8. Kallus oranına ploidi x karbon kaynakları interaksyonunun etkisi..... | 39 |
| Şekil 4.2.9. Kallus oranına ploidi x hormon interaksyonunun etkisi..... | 40 |
| Şekil4.2.10.Kallus oranına karbon kaynakları x hormon interaksyonunun etkisi..... | 40 |
| Şekil 4.3.1. Kallus büyüklüğüne ön işlemin etkisi..... | 43 |
| Şekil 4.3.2. Kallus büyüklüğüne ploidinin etkisi..... | 44 |
| Şekil 4.3.3. Kallus büyüklüğüne karbon kaynaklarının etkisi..... | 44 |
| Şekil 4.3.4. Kallus büyüklüğüne hormonların etkisi..... | 45 |
| Şekil4.3.5. Kallus büyüklüğüne ön işlem x ploidi interaksyonunun etkisi..... | 45 |
| Şekil 4.3.6.Kallus büyüklüğüne ön işlem x karbon kaynakları interaksyonunun etkisi..... | 46 |
| Şekil 4.3.7.Kallus büyüklüğüne ön işlem x hormon interaksyonunun etkisi..... | 46 |
| Şekil4.3.8.Kallus büyüklüğüne ploidi x karbon kaynakları interaksyonunun etkisi..... | 47 |
| Şekil4.3.9.Kallus büyüklüğüne ploidi x hormon interaksyonunun etkisi..... | 47 |
| Şekil4.3.10.Kallus büyüklüğüne karbon kaynakları x hormon interaksyonunun etkisi..... | 48 |
| Şekil 4.4.1. Sert yapılı kallusların genel görünümü..... | 51 |
| Şekil 4.4.2. Yumuşak yapılı kallusun genel görünümü..... | 51 |
| Şekil 4.4.3. Diploid çavdar anterlerinden oluşan kallusların kök gelişimi..... | 51 |
| Şekil 4.4.4. Gelişme ortamına aktarılan tetraploid çavdar kalluslarında kök oluşumu..... | 52 |
| Şekil 4.4.5. Diploid çavdar anterlerinden bitkicik rejenerasyonu..... | 53 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | Sayfa |
|---|--------------|
| Çizelge 3.2.2.1. Modifiye edilmiş N ₆ ortamında kallus oluşum ortamı ve gelişme ortamının içeriği..... | 18 |
| Çizelge 3.2.2.2.Ploidi seviyeleri ve karbon kaynaklarına (maltoz ve sakaroz) göre IAA, 2,4-D ve kinetin konsantrasyonları..... | 19 |
| Çizelge 4.1.1. Çavdarda (<i>S. cereale</i>) tepki gösteren anter oranına ait varyans analiz sonuçları..... | 25 |
| Çizelge 4.1.2. Çavdarda (<i>S. cereale</i>) ön işlem, ploidi, karbon kaynağı ve hormon uygulamalarında anter tepki oranları (%)..... | 26 |
| Çizelge 4.1.3. Anter tepki oranına ön işlem x karbon kaynakları x hormon interaksyonunun etkisi..... | 32 |
| Çizelge 4.1.4. Anter tepki oranına ploidi x karbon kaynakları x hormon interaksyonunun etkisi..... | 33 |
| Çizelge 4.1.5. Anter tepki oranına ön işlem x ploidi x karbon kaynakları x hormon interaksyonunun etkisi..... | 34 |
| Çizelge 4.2.1. Çavdarda (<i>S. cereale</i>) kallus oranına ait varyans analiz sonuçları..... | 35 |
| Çizelge 4.2.2. Çavdar (<i>S. cereale</i>)’da ön işlem, ploidi, karbon kaynakları ve hormon uygulamalarında kallus oranları (%)..... | 35 |
| Çizelge 4.2.3. Kallus oranına ön işlem x ploidi x karbon kaynakları x hormon interaksyonunun etkisi..... | 41 |
| Çizelge 4.3.1. Çavdarda (<i>S. cereale</i>) kallus büyüklüğüne ait varyans analiz sonuçları..... | 42 |
| Çizelge 4.3.2. Çavdarda (<i>S. cereale</i>) ön işlem, ploidi, karbon kaynakları ve hormon uygulamalarında kallus büyüklükleri (mm)... | 43 |
| Çizelge 4.3.3. Kallus büyüklüğüne ön işlem x ploidi x karbon kaynakları interaksyonunun etkisi | 49 |

| | |
|---|----|
| Çizelge 4.3.4. Kallus büyüklüğüne ön işlem x karbon kaynakları x hormon interaksiyonunun etkisi..... | 49 |
| Çizelge 4.3.5. Kallus büyüklüğüne ön işlem x ploidi x karbon kaynakları x hormon interaksiyonunun etkisi..... | 50 |

1.GİRİŞ

Çavdar (*Secale cereale* L.), Secale cinsinin kültüre alınmış tek türü olup, sıcaklık ve nem isteği en düşük olan tahıldır. Çimlenme ve ilk gelişme dönemlerinde 0°C' de gelişmesini yavaş da olsa sürdürebilmektedir. Ayrıca, bitki kar örtüsü olmaksızın 30°C gibi düşük sıcaklıklara dayanabilmektedir (Kün, 1988). Dünya'da çavdarın ekim alanı 7.5 milyon ha; verimi 261.1 kg/da; üretimi 19.5 milyon tondur. Ülkemizde ise ekim alanı 150 bin ha; verimi 184.7 kg/da; üretimi 277 bin tondur. (Anonymous, 2004).

Çavdarda ıslah çalışmaları diğer bitki türlerinde olduğu gibi, başta seleksiyon ve melezleme ıslahı olmak üzere klasik yöntemlerle yapılmaktadır. Ancak seleksiyon ile istenilen özellikleri kombine eden tek bir bireyin elde edilmesindeki olanaksızlıklar, melezleme ıslahında ise yüksek heterozigot kalıtsal yapı, uzun generasyon süresi, uygun genetik özelliklere sahip melezlerin seçiminin uzun zaman alması, bağlı genler nedeniyle istenmeyen bazı özelliklerin döllere geçmesi ve melezleme depresyonu nedeniyle kendilemenin engellenmesi gibi bir takım dezavantajları ile son derece uzun bir süreci gerektirmektedir.

Bitki ıslahçıları son zamanlarda, stabil verime sahip, kaliteli ve stres faktörlerine genetik olarak dayanıklı yeni çeşitler geliştirmek üzere modern teknikleri (biyoteknoloji) kullanmaktadırlar (Bohorova, 1988; Škoric, 1993). Biyoteknolojinin sınırları çok geniş olup değişik uygulama alanlarını içine almaktadır. Doku kültürü genel bir deyim olup, izole edilmiş bitki organları (kökler, sürgün uçları, embriyolar vb.), anterler ve polen (haploidler üretiminde), kallus dokuları, hücreler ve protoplastların özel ve steril koşullarda kapalı ve genellikle cam kaplarda (in vitro) yapay besi ortamlarına konularak büyümeye bırakılması şeklinde tanımlanabilir. Bu nedenle yöntemin diğer adları “Mikro üretim” veya “Aseptik kültür”dür (Ingram,1980; Gönülşen, 1987).

Bitki doku kültürü teknikleri içerisinde haploid bitkilerin elde edilmesini sağlayacak ıslah çalışmalarına hizmet eden anter kültürü ayrı bir öneme sahiptir. Anter kültürü

tekniki ile mikrosporlardan haploid bitkilerin elde edilmesi organogenesis ya da embriyogenesis yolu ile gerekleŒmektedir. Klasik ıslah yöntemleri ile kendilenmiŒ homozigot hatların elde edilmesi uzun yıllar alan türlerde, anter kültürü tekniği ile elde edilen bitkilerin kromozomları katlanarak daha kısa zamanda homozigot hatları ya da bitkileri elde etmek mümkün olabilmektedir (Choo ve ark., 1985; Morrison ve ark., 1986; Snape, 1989). Yine sitolojik araŒtırmalarda, melezleme ıslahında mutasyon ıslahında ve aneuploid bitkilerin elde edilmesinde anter kültürü tekniği kullanılabilmektedir (Pierik, 1987; Er ve Canpolat, 1992; Ekingen, 1994).

Anter kültürü tekniği ilk defa *Datura innoxia* (Guha ve Maheshwari, 1964) bitkisinde baŒarı ile kullanılmıŒtır. Daha sonra konu ile ilgili araŒtırmalar hızla yođunlaŒmıŒ ve günümüzde 26 familyadan 60 cinse ait 171 bitki türünde baŒarılı sonuçlar elde edilmiŒtir. in’de yapılan araŒtırmalarda anter kültürü tekniği kullanılarak 81 eltik ve 20 buğday eŒit/hattı ile 100 mısır hattı geliŒtirilmiŒtir. Yine Avrupa’nın anter kültürü yoluyla geliŒtirilmiŒ ,ilk buğday eŒidi ‘Florin’ adı ile tescil edilmiŒtir (Veilleux, 1994).

Anter kültürü uygulamalarının özellikle tahıllarda bazı problemleri bulunmaktadır. Bu tekniğin yaygın olarak kullanılmasını engelleyen en önemli faktörlerden birisi farklı genotiplerin anter kültürüne farklı reaksiyon göstermesidir. Yine, yapılan araŒtırmalarda donör bitkilerin yetiŒme koŒulları, mikrosporların geliŒme devresi, anterlerin kültüre alınmadan önce veya sonra dŒk sıcaklığa maruz bırakılması ve in-vitro kültür ortamı anter kültüründe baŒarıyı etkileyen faktörler olarak ortaya ıkmıŒtır (Fadel ve Wenzel, 1990; Yıldırım ve ark., 1990; Flehinghaus ve ark. 1991; Hatipoğlu ve Genç, 1992; Daniel, 1993; Immonen, 1999; Dağüstü, 2002).

Bu alıŒmada tetraploid ve diploid kültür avdarında anter kültürü tekniği kullanılarak haploid bitkilerin elde edilmesi planlanmıŒtır. AraŒtırmada farklı uygulamaların (n iŒlem, ploidi, karbon kaynağı ve büyümeyi düzenleyicileri) embriyonik kallus oluŒumu üzerine etkileri incelenmiŒtir. Uygun ortamlar belirlendikten sonra, ileride yapılacak alıŒmalarla haploid bitkilerin oranının arttırılmasına alıŒılacak ve kolisin uygulanarak homozigot bitkiler elde edilecektir.

Bu bitkiler, *S. cereale* x *S. montanum* melezlemelerinde kullanılarak, yem bitkisi olarak değerlendirilecek yeni çeşitlerin elde edilmesine çalışılacaktır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Haploid bitkilerin bitki ıslahındaki önemi anlaşıldıktan sonra, değişik bitki türlerinde anter ya da polenlerin kültüre alınması üzerine çok sayıda araştırma yapılmıştır. İlk anter kültürü çalışmaları La Rue, Tulecke, Guha ve Mahashuari tarafından yapılmıştır (Nitsch, 1983). Haploid üretim çalışmalarının çoğunda sadece kallus elde edilebilirken, bazılarında ise embriyo gelişimi sağlanabilmiştir. İlk haploid bitkiler *Datura innoxia*'da anter kültürü yoluyla elde edilmiştir (Guha ve Maheshwari, 1964). Daha sonra da Bourgin ve Nitsch (1967) tütünde haploid bitkileri elde etmeyi başarmışlardır. Kendine tozlaşan arpa (*Hordeum vulgare* L.), buğday (*Triticum aestivum* L.) ve çeltik (*Oryza sativa* L.) gibi bitkilerin ıslah programlarında seleksiyon etkinliği ve zaman kazancı yönünden Double Haploid (DH) bitkiler kullanılmıştır (Jain ve ark., 1996).

Tahıllarda anter kültürü yoluyla yeşil bitkilerin rejenerasyonunun oldukça zor olduğu, yeşil bitki rejenerasyonunun kompleks bir genetik sistem tarafından kontrol edildiği ve bu sistemin de çevresel faktörler tarafından etkilendiği bildirilmiştir (Immonen ve Anttila, 1998; Zhou, 1996). İn-vitro şartlarında androgenesis ve somatik embriyogenesiste çekirdek ve stoplazmada bulunan genetik faktörler önemlidir (Henry ve ark., 1994). Buğday üzerine yapılan bir çalışmada, embriyo ve kallus oluşumuna ayrı kromozomlar üzerinde bulunan genlerin etkili olduğu ortaya konulmuştur (Lazar ve ark., 1987). Yine, çeltikte anterlerden ve olgunlaşmamış embriyolardan bitki rejenerasyonunun farklı genler tarafından kontrol edildiği bildirilmiştir (Mikami ve Kinoshita, 1988). *Nicotiana tabacum*'da 1 anterden 20 haploid bitki üretilmesine karşın, 10 bin buğday anterinden yalnızca bir bitkinin elde edildiği ileri sürülmüştür (Straub, 1977). Knudsen ve ark. (1989), tarafından farklı arpa varyetelerinin kullanıldığı bir çalışmada, varyetelere göre kalluslardan embriyo oluşumu ve yeşil rejenerantların oranının önemli derecede farklı olduğu ortaya konulmuş ve tüm varyetelerde ortalama % 1.6 oranında yeşil bitki elde edilmiştir.

Bitki genotipi androgenetik haploidlerin teşvikinde önemli bir etkiye sahiptir (Johri ve Rao, 1984). Androgenik kapasite üzerinde genotipin rolü mısır (Petolino ve Jones,

1986), ekmeklik buğday (Bullock ve Baenziger, 1982; Liang ve ark., 1987; Foroughi-Wehr ve Zeller, 1990; El Haddoury ve ark., 1993), çeltik (Abe ve Futsuhara, 1986) ve tütünde (Hatipoğlu ve Sakin, 1996) yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur.

Türler arasında, kallus veya embriyoidlerin rejenerasyon kabiliyetleri yönünden farklılık olduğu gibi, tür içinde de farklılıklar görülmekte ve genotipler yüksek tepkimeli, düşük tepkimeli veya duyarlı-duyarlı olmayan genotipler şeklinde isimlendirilmektedir (Dunwell ve ark., 1987; Larsen ve ark., 1991).

Androgenik çavdar haploidlerin üretimi ilk olarak Wenzel ve Thomas (1974) tarafından bildirilmiş ve anter kültürü yoluyla çavdarda double haploidlerin elde edilmesi üzerinde günümüze kadar bir çok çalışma yapılmıştır (Wenzel ve Thomas, 1974; Thomas ve ark., 1975; Wenzel ve ark., 1977; Flehinghaus ve ark., 1991; Daniel, 1993; Flehinghaus-Roux ve ark., 1995). Ancak çavdar, uygulanan işlemlere karşı zor tepkime veren bir tür olduğu için, embriyonik kallus ve embriyoidlerin oranı çok düşük oranda kalmıştır (Wenzel ve Foroughi-Wehr, 1990). Çavdarda anter kültüründe elde edilen başarı bir çok faktöre bağlı olup, donör bitkinin genotipi bu faktörlerin başında gelmektedir (Wenzel ve ark., 1976; Bajaj, 1983; Milewska-Pawliczuk, 1987; Flehinghaus ve ark., 1991; Guo ve Pulli, 2000). Çavdar üzerinde yapılan bir çalışmada, rejenerasyon oranının % 0.01-% 0.20 arasında olduğu ortaya konulmuştur (Flehinghaus ve ark., 1991).

Farklı çavdar genotiplerinin ve kültür ortamının kullanıldığı bir çalışmada tüm genotipler için uygun tek bir ortam belirlenememiştir. Araştırmada genotiplerin ortama tepkisi farklı olmuştur. Genotiplere göre kallus oluşum oranı % 0.00-% 11.94 arasında değişmiştir (Rakoczy-Trojanowska ve ark., 1997).

Çeliksaş ve Hatipoğlu (1997) tarafından arpa üzerine yapılan bir çalışmada kültüre alınan 14400 anterden tüm varyantların ortalaması olarak % 0.27'lik bir tepki oranı elde edilmiş ve bu oranın genotiplere bağlı olarak % 0.00-1.31 arasında değiştiği ortaya konulmuştur.

Saidi ve ark. (1997), *Triticum turgidum* ssp. durum buğdayında 17 genotip üzerinde yaptıkları bir çalışmada, haploid embriyoların oluşumunun 1726 çeşidinde % 25.37'ye kadar ulaştığını göstererek genotipin etkisinin önemli olduğunu ortaya koymuşlardır.

Anter kültüründe başarıyı etkileyen en önemli faktörlerden biri de polenin gelişme dönemidir. İzole edilecek anterin, polen tanesinin gelişme safhası bakımından en uygun safhada olması gerekir. Bu safha çok kısa bir zaman periyodunu kapsar ve mayoz bölünme sonucu oluşan tetrad ile başlar ve ilk polen mitozu ile biter. Bitki genotipleri arasında ve içinde çok değişkenlik olmakla birlikte en yüksek anter tepkisi, polen tanesinin tek çekirdekli olduğu dönemde elde edilmiştir. Yapılan araştırmalar da ilk polen mitozu civarındaki bir evrenin çavdarda androgenetik oluşum için optimal olduğu ortaya konulmuştur (Wenzel ve Thomas,1974; Thomas ve ark., 1975; Flehinghaus-Roux ve ark., 1995) Yine, bazı genotiplerde erken iki-çekirdekli evredeki mikrosporların daha etkili olduğu bildirilmektedir (Lorenz, 1989). Diğer taraftan He ve Quyang (1984), buğdayda anter kültüründe tek çekirdekli evrenin dışında mikrospor kullanılırsa, albimizimin arttığını ileri sürmüştür.

Arpa üzerinde yapılan bir araştırmada, başakların orta kısımlarında bulunan başakçıklara ait çiçeklerden alınan anterlerin, anter kültüründe haploid bitki üretimi için uygun olduğu ortaya konulmuştur (Huang ve Sunderland, 1982; Powell, 1988). Yine ekmeklik ve makarnalık buğday genotiplerinde yapılan bir çalışmada, başakların orta kısımlarında bulunan başakçıklara ait çiçeklerden alınan anterlerde orta ve geç tek çekirdekli mikrospor döneminin kültür için uygun olduğu tespit edilmiştir (Gürel ve ark., 1993).

Farklı indica çeltik çeşitlerinin kullanıldığı bir çalışmada, en yüksek kallus oluşumu için en iyi mikrospor evresinin orta-tek çekirdekli evre olduğu belirlenmiş ve bu evre başakçıkların sarımsı yeşil renk aldığı dönem olarak tespit edilmiştir (Shahjahan ve ark., 1992). Yine, Yin ve ark. (1976), Japonica çeltik çeşidinde kallus oluşumu için en iyi mikrospor döneminin geç-tek çekirdekli evre olduğu ve başakçıkların sarımsı

yeşil renk aldığı ve erkek organların uzunluğunun dış kavuzlarının 1/2- 1/3 arasında olduğu dönem olarak belirlemiştir.

Çavdar üzerine yapılan bir çalışmada yeşil bitkilerin rejenerasyonunda anter uzunluklarının etkisi araştırılmıştır. Araştırma sonunda 4.5 ve 5.5 mm uzunluğundaki anterlerden yeşil bitki elde edilememiş fakat 5 mm uzunluğundaki anterlerden en iyi yeşil bitki rejenerasyonu gözlemlenmiştir. Ayrıca mikrosporların tek çekirdekli bir evrede daha uygun olduklarını da belirlenmiştir (Immonen ve Anttila, 1998).

Afza ve ark. (2000) tarafından Japonica çeltik çeşidinde salkımın farklı kısımlarının kallus oluşumu üzerine etkileri incelenmiştir. Araştırmacılar farklı başakçık pozisyonlarının, anterlerin kallus oluşturabilme yetenekleri üzerine önemli derecede etkili olduğunu bildirmişlerdir. Alt kısımdan alınan başakçıklara ait anterlerden kallus oluşturabilme yeteneği % 20, orta kısımda % 12, uç kısımlardan alınan başakçıklarda ise % 8 olduğunu belirlemiştir. Araştırmacılar asimilasyon ürünlerinin, aminoasitlerin ve karbonhidratların başakçığın alt kısımlarında üst kısımlarına göre daha fazla bulunduğunu ve bu durumun kallus oluşum yeteneğini etkileyebileceğini bildirmişlerdir. Yine donör bitkilerde oluşan hormonların (endogenous) ve aminoasitlerin dağılımının, farklı kısımlardan alınan anterlerin kallus oluşum yeteneğini etkileyebileceği Bei (1992) tarafından bildirilmiştir.

Anter kültürü çalışmalarında başağa veya antere uygulanan belirli ön işlemler mikrospor gelişimi üzerine olumlu etki yapmaktadır. Anter kültüründe etkili yöntemlerden birisi de soğuk uygulamasıdır. Anterler kültüre alınmadan belirli bir süre soğuk koşullarda muhafaza edildiklerinde polenlerden kallus oluşumu artmaktadır. Soğuk uygulamasının, mikrosporların daha uzun süre canlı kalmasını ve yaşlanmasını geciktirdiği Bajaj (1983) tarafından ileri sürülmüştür. Yine anterlerin ön işleme tabi tutulması ile zayıf veya güçlü olmayan anterlerin ve mikrosporların öldürüldüğü, böylece başakların kuvvetli ve canlı mikrosporlarca zenginleştirildiği (Vasil, 1980), androgenesis için başlıca aminosit ve proteinlerin serbest bırakıldığı ve polen duvarı yaşlılığının gecikmesini sağladığı farklı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Fang ve Liang, 1985; Xie ve ark., 1997; Kiviharju ve Pehu, 1998).

Tahıllarda anter kültüründe, stres uygulamasının gametofik gelişmeyi engellediği ve mikrosporlarda polen embriyogenesisini tetiklemek için gerekli olduğu ileri sürülmüştür (Heberle- Bors ve ark., 1996).

Çavdarda androgenesisin sıklığını arttırmak için birçok çalışmada hasattan sonra başaklara soğuk uygulaması yapılmıştır (Thomas ve ark., 1975; Lorenz, 1989; Flehinghaus ve ark., 1991; Daniel, 1993; Guo ve Pulli, 2000). Yine başaklara düşük sıcaklık uygulaması çeltik (Genovesi ve Maggill, 1979) ve arpa (Huang ve Sunderland, 1982) bitkilerinde androgenesisini teşvik etmede olumlu bir faktör olarak bulunmuştur.

Arpada farklı hat ve çeşit kullanılarak yapılan bir çalışmada anterlere 0, 7, 14, 21 ve 28 gün sürelerle +4 °C'de soğuk ön uygulaması yapılmıştır. Araştırmacılar genotiplere göre ön uygulama süresi değişmekle birlikte, tepki gösteren anter oranı yönünden 14 günlük sürenin uygun olduğu bildirilmiştir (Szarejko ve Kasha, 1991). Yine çavdar üzerinde yapılan bir çalışmada en yüksek yeşil bitki rejenerasyonu 2-4 haftalık soğuk uygulamasından elde edilmiştir (Immonen ve Anttila, 1996). Diğer taraftan Deimling ve Flehinghaus-Roux (1996) çavdarda 1 hafta +4 °C'lik soğuk ön işlem uygulamasını önermişlerdir.

Farklı çavdar genotiplerinin kullanıldığı diğer bir çalışmada, tek çekirdekli gelişme dönemindeki mikrosporları içeren başaklar 4 °C ve karanlıkta su içinde 0-5 hafta süre ile soğuk ön işlem uygulamasına maruz bırakılmıştır. Araştırmada 1-4 hafta arasındaki soğuk ön işlem uygulaması arasında anter tepki oranı yönünden bir farkın olmadığı bildirilmiştir (Ma ve ark., 2004). Yine, Lezin ve ark. (1996), farklı arpa genotiplerini kullanarak yaptıkları bir çalışmada, 4 °C 14 günlük soğuk uygulamasının anterlerde kallus oluşumunu ve buna bağlı olarak yeşil bitki rejenerasyonunu arttıracaklarını saptamışlardır. Yine, Saidi ve ark. (1997), farklı makarnalık buğday genotiplerinde 3 °C ve 8 günlük soğuk uygulamanın tüm genotipler için optimal olduğunu bulmuşlardır.

Kültürde kullanılan besin ortamının yapısı, bileşimi ve özellikle içerdiği büyüme düzenleyici madde tipi ve konsantrasyonları, tüm bitkilerde olduğu gibi çavdarda da anter kültüründen elde edilen başarıyı doğrudan etkileyen faktörler arasında yer almaktadır. Genel olarak besin ortamının kompozisyonu, inorganik besin maddeleri, hormonlar ve şeker olmak üzere üç unsurdan oluşmaktadır. Aralarında çok az değişiklik olan White, Murashige ve Skoog, Laismaier ve Skoog, Blaydes, Nitch ve Chu'nin makro ve mikro inorganik besin maddeleri bugüne kadar kullanılmakta olup, bitki türlerine bağlı olarak da bazı değişikliklere uğratılmıştır.

Değişik tahıl türleri için en uygun ortamı belirlemek zordur. Türler veya hatta genotipler, farklı besin ortamlarına ihtiyaç duyabildiklerinden dolayı genel bir öneri verilememektedir (Gürel ve ark., 1992). Anter kültürü tekniğinde başarıya ulaşılabilmesi için optimum başlangıç ve rejenerasyon kültür ortamları seçilmelidir (Dağüstü, 2002).

Tahıllarda anter ve mikrospor kültürlerinde yeşil bitki rejenerasyonu önemli bir problem olmuştur. Arpa bitkisinde anter kültürü için başlangıç ortamları olarak Patates Ekstrakt ortamı 2, modifiye edilmiş MS ve N₆ ortamları çoğunlukla kullanılmaktadır (Jing ve Hu, 1987). Farklı ekmeklik buğday genotipi üzerinde yapılan bir çalışmada izole edilen anterler 2 mg/l 2,4-D (2,4 diklorofenoksi asetik asit) içeren modifiye yapılmış MS ortamında kültüre alındığında anterlerin oluşturduğu embriyoid yüzdesinin % 3.7-28.0 arasında değiştiği ve anterlerden elde edilen yeşil bitki yüzdesinin ise % 22.4 olduğu belirlenmiştir (Lachermes, 1989).

Çavdar üzerine yapılan çalışmalarda büyüme düzenleyicilerinin düşük seviyelerde veya hiç içermeyen modifiye edilmiş N₆ (Flehinghaus ve ark., 1991; Daniel, 1993) ve 190-2 ortamı (Guo ve Pulli, 2000) kullanılmıştır. Yine çavdar da modifiye edilmiş N₆ ortamı kullanarak yapılan bir araştırmada 100 adet anterden 20 adet yeşil bitki rejenerasyonu elde edilmiş ve başlangıç besi ortamının kompozisyonu değiştirilerek rejenerasyon oranının artırılabilceği ileri sürülmüştür (Flehinghaus ve ark., 1991).

Farklı çavdar inbred hatları kullanılarak yapılan bir çalışmada anter kültürü üzerine ortamların etkisi araştırılmıştır. Başlangıç ortamı olarak modifiye edilmiş iki N₆ ortamı (CI ve CIP) ile patates ekstratlı iki ortam (P2C ve P2I) kullanılmıştır. Genotiplere göre kallus oluşumu üzerine ortamların etkisi farklı olmuş ve genotip x ortam interaksiyonu önemli bulunmuştur. Araştırmada en yüksek kallus oranı N₆ ortamına dayandırılan CI ortamından elde edilmiştir (Rakoczy–Trojanowska ve ark., 1997).

Silva ve ark.(1997) tarafından yapılan bir çalışmada, anter tepki oranının N₆ ortamında (% 30.32) MS ortamından (% 6.90) daha iyi olduğu ortaya konulmuştur. *L. temulentum* üzerinde yapılan bir çalışmada, modifiye edilmiş LS-3 (Linsmaier ve Skoog) ortamı ve N₆ ortamı kullanılmıştır. Araştırmada anter tepki oranı N₆ ortamında % 0.06, LS-3 ortamında ise % 30 olarak belirlenmiş ve *L. temulentum*'da anter kültürü için LS-3 ortamının daha uygun olduğu önerilmiştir (Wang ve ark., 2005).

Anter kültüründe bitki rejenerasyonunu ve kallus oluşumunu etkileyen faktörler arasında sıcaklık, kültür ortamı kompozisyonu da (oksinler, aminoasitler ve karbon kaynakları) yer almaktadır. Genellikle kallus oluşumu için yalnız başına ve sitokininlerle beraber kullanılan oksinler [IAA (Indol asetik asit), IBA (Indol butirik asit), NAA (Naftalin asetik asit), 2,4-D vs.]; hücre bölünmesi, apikal dormansinin değiştirilmesi, kallus veya diğer organlarda farklılaşmanın sağlanması amacıyla sitokininler [kinetin, BAP (Benzil amino purin), zeatin vs.] ve nadiren olsa bitkinin normal gelişmesinin hızlandırılması amacıyla gibberalinler, besi ortamına ilave edilirler. Yalnız tek bir oksinin kullanımı yerine bitki büyüme düzenleyicilerinin kombinasyonunun kullanılması daha iyi sonuçlar verebilmektedir. Çünkü BA (Benzil adenin) çok hücreli gelişmeyi sağlarken, 2,4-D iki çekirdekli polenin bozulmasını azaltmakta ve NAA'de başlangıç kültür evresinde androgenesisin frekansını teşvik etmektedir. İn vitro kültür çalışmalarında besi ortamının en önemli öğelerinden birisini oluşturan büyüme düzenleyicilerinin etkisi bitki türüne ve kullanılan eksplanta göre değişmektedir (Hatipoğlu, 1993).

Tahıllarda anter kültüründe kallus oluşumu için bitki gelişme düzenleyicileri içinde oksinler esastır. Kallus oluşumu kültür ortamındaki varolan oksinlerin tipi veya seviyesi ile düzenlenebilir. 2,4-D embriyonik olmayan kallusların oluşumunu ve hızlı hücre çoğalmasını teşvik ederken, IAA ve NAA direk androgenesisini teşvik edebilmektedir (Ball ve ark.,1993).

Farklı kışlık ve yazlık buğday çeşitlerinin kullanıldığı bir çalışmada, 2,4-D ilave edilen MS ortamının anterde kallus oluşumu üzerine olumlu etkisinin bulunduğu belirlenmiştir (Dube, 1984.). Diğer taraftan ekmeklik buğdayda modifiye edilmiş N₆ ortamına 2 mg/l 2,4-D, 1 mg/l NAA ve % 9 (w/v) sakarozun ilave edilmesi ile polen embriyoidlerin gelişmesi sağlanmıştır. (Chu ve Hill, 1988).

Farklı arpa hat ve çeşitlerine ait anterler farklı konsantrasyonlarda 2,4-D içeren (2, 4, 6, 8 mg/l) N₆ ortamında kültüre alınmıştır. Araştırma sonucunda tepki gösteren anter oranının genotiplere göre değiştiği ve istatistiki olarak kallus oluşumu üzerine 2,4-D konsantrasyonlarının etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Çelikaş ve Hatipoğlu, 1997).

Çeltik üzerinde yapılan bir çalışmada, N₆ ortamına 4 mg/l 2,4-D eklenmesi mikrospordan kallus oluşumunu önemli ölçüde teşvik etmiştir (Shimada ve ark., 1999).

Kültür yulafı (*Avena sativa*) ve yabani yulaf (*Avena sterilis*) üzerinde yapılan bir çalışmada, 2,4-D ve kinetinin etkileri incelenmiştir. Her iki genotipte de embriyo üretimi 2,4-D'nin yüksek konsantrasyonlarında (5-6 mg/l) elde edilmiş, kinetinin yüksek konsantrasyonları ise bozulmalara neden olmuştur (Kiviharju ve Tauriainen, 1999).

Çeltik bitkisinde yapılan bir çalışmada, anterden kallus oluşumu üzerine farklı oksin konsantrasyonlarının (2,4-D, NAA ve IAA) ve karbon kaynaklarının (maltoz ve sakaroz) etkisi incelenmiştir. Araştırma sonucunda kallus oluşumu üzerine farklı oksin konsantrasyonlarının etkileri genotipe bağlı olarak değişmiş ve oksinlerin kallus oluşumu için gerekli olduğu belirlenmiştir. En fazla kallus oluşumu 8 günlük

soğuk uygulamasında, 10.74 μ M NAA ve 30 g/l maltoz içeren ortamda elde edilmiştir (Trejo-Tapia ve ark., 2002).

Besin ortamının karbonhidrat ihtiyacını temin etmek ve ortamın ozmotik basıncının ayarlanması amacıyla ilave edilen şekerin miktarı, bitki genotipine bağlı olarak anter tepkisini etkileyebilmektedir. Yüksek düzeyde kullanılan şeker, enerji kaynağı olarak solunumu ve metabolik aktiviteyi hızlandırarak, hücre bölünmesi ve embriyoid oluşumunu artırmaktadır (Kandeler, 1987). Bununla birlikte, şekerin anter kültüründe diploid hücrelerin bölünmesini engellediği, buna karşılık haploid hücrelerin bölünmesini teşvik ettiği ileri sürülmüştür (Vidalie, 1984).

Mikrospor embriyogenesisinde karbon kaynakları önemli rol oynamaktadır. Ortamda sakarozun düşük konsantrasyonlarda bulunması durumunda yeşil bitkicik üretiminin organogenesis yoluyla meydana geldiği, yüksek konsantrasyonlarda ise doğrudan embriyogenesisin olduğu bildirilmiştir (Sorvari ve Schieder, 1987). Genel olarak % 6-12 arasındaki sakarozun uygun olduğu belirlenmiştir (Vasil, 1980). Daha önceki çalışmalarda sakaroz en çok kullanılan karbon kaynağı olmasına rağmen, son zamanlarda araştırmacılar maltoz gibi diğer karbonhidratları da kullanmaya başlamışlardır (Hu ve ark., 1991). Arpada anter kültüründe sakaroz yerine maltozun kullanılmasıyla rejenerasyon oranında önemli artışın meydana geldiği Hunter (1987) tarafından bildirilmiştir. Tahıllarda maltozun embriyo gelişiminin arttırılmasında ve yeşil bitki rejenerasyonunda önemli bir etkiye sahip olduğu Kuhlmann ve Foroughi-Wehr (1989) tarafından ileri sürülmüştür.

Çavdar üzerinde yapılan bir çalışmada, karbonhidrat kaynaklarının (sakaroz ve maltoz) farklı konsantrasyonları, sıcaklık uygulamaları ve katılaştırma maddelerinin etkileri incelenmiştir. Başlangıç ortamında maltozun olumlu bir etkisinin olduğu belirlenmiştir. En yüksek rejenerasyon oranı, 120 g/l maltoz ve 90 g/l sakarozda elde edilmiştir (Flehinghaus ve ark., 1991).

Triticale üzerine yapılan bir çalışmada haploid bitki oluşumu üzerine farklı ortam ve karbonhidrat kaynaklarının (maltoz ve sakaroz) etkisi araştırılmıştır. Araştırma

sonucunda embriyoid oluşumu % 0.00-11.90, yeşil bitki rejenerasyonu ise % 0.00-0.88 arasında değişmiştir. En fazla yeşil bitki rejenerasyonu maltoz uygulamasından elde edilmiştir (Marciniak ve ark., 1998).

Arpada farklı kültür ortamlarına (MS, N₆ ve NN) 2,4-D, kinetin, BAP, NAA, maltoz ve sakarozun değişik konsantrasyonları eklenmiş ve en yüksek bitki rejenerasyonu MS ortamına 2.4 µmol/l kinetin, 4,4 µmol/l BAP, 2.7 µmol/l NAA, 87.7 µmol/l sakaroz ilave edilmesiyle sağlanmıştır (Dedicova ve ark., 1999).

Çavdar üzerinde yapılan çalışmalarda anter kültüründe % 6, % 9 ve % 12 maltoz seviyeleri katı kültür ortamlarında kullanılmıştır (Flehinghaus ve ark., 1991; Daniel, 1993; Rakoczy-Trojanowska ve ark., 1997). Çavdar üzerinde yapılan farklı bir araştırmada, mikrospor embriyogenesi ve bitki rejenerasyonu için en uygun şeker konsantrasyonunun % 6'lık maltoz olduğu belirlenmiştir (Guo ve Pulli, 2000). Yine Ma ve ark. (2004) tarafından yapılan bir çalışmada, çavdarda en fazla kallus oluşumu ve yeşil bitki rejenerasyonu sırasıyla % 6 ve % 9'luk maltoz seviyesinde tespit edilmiştir.

Farklı ekmeklik buğday varyetelerinin kullanıldığı bir çalışmada genotipin etkisi, başaklara ön işlem uygulaması, ortamın ve ortama ilave edilen karbon kaynaklarının etkisi incelenmiştir. En yüksek kallus oluşumu, başaklara 2 hafta 4 °C ön işlem uygulamasından elde edilmiş, genotipler arasında kallus oluşumunda önemli farklılıklar belirlenmemiş ve çeşitler arasındaki kallus oluşumu % 3-7 arasında değişmiştir. Ortama ilave edilen karbon kaynağı olarak sakarozun uygulanması, kallus oluşumunda önemli bir artış sağlamıştır (Dağüstü, 2002).

Androgenesi kontrol eden en önemli faktörlerden birisi de donör bitkilerin fizyolojik koşullarıdır (Vasil, 1980; Chen, 1988; Hatipoğlu ve Sakin, 1996). Anter alım zamanında bitkilerin fizyolojik durumları, anterdeki mikosporların sporofitik potansiyelini etkilemektedir (Gürel ve ark., 1992).

Donor bitkilerin yetiştirme koşulları da anter kültüründe etkili bir faktör olmaktadır. Bitkilerin yetiştirildiği dönemdeki sıcaklık, ışık yoğunluğu, günlük ışıklandırma süresi, havadaki CO₂ konsantrasyonu ve bitkinin beslenme koşulları başta olmak üzere tüm çevresel faktörler, bu bitkiden alınan anterlerden elde edilecek başarıyı etkilemektedir (Dodds ve Roberts, 1985).

Genelde arazide yetiştirilen bitkilerin, büyüme odası veya serada yetiştirilenlere göre daha iyi donör bitkiler oldukları belirtilmiştir. 20000 lüks altında yetişen bitkilerden alınan anterlerin tepkisi, daha düşük ışık intensitesi altında büyüyen bitkilerden daha yüksektir (Gürel ve ark., 1992). Farklı arpa çeşitleri kullanılarak yapılan bir araştırmada arazide yetiştirilen donör bitkiden alınan anterlerden meydana gelen ortalama yeşil rejenerantların oranı % 22.80, büyüme odalarında yetiştirilen donör bitkilerden alınan anterlerin oluşturduğu yeşil rejenerantların oranı ise % 14.30 olmuştur (Knudsen ve ark., 1989).

Kültürlerin inkübasyonu sırasındaki gece-gündüz sıcaklığı, fotoperiyodik düzen, CO₂ oranı ve kültürün süresi de anter kültüründe başarıyı etkileyen faktörlerdendir. Tahıllarda anter kültürü için ortam sıcaklığı 20-26 °C arasında değişim göstermektedir. Genellikle karanlık aydınlık ortamdan daha etkili bulunmuştur. Ayrıca fotoperiyot ve ışık intensitesi araştırmacılara göre değişiklik gösterebilmektedir (Jing ve Hu, 1987; Li ve ark., 1991).

Kültürde kullanılan besi ortamının katı, sıvı ve yarı katı olması da anter kültüründe başarıyı etkileyen faktörler arasında sayılmaktadır. Nitekim Zhou ve Konzak (1989), buğday anter kültüründe sıvı ortamların kallus uyarılmasında daha iyi sonuç verdiğini, ancak katı ortamlara göre daha düşük oranlarda bitki rejenerasyonunu sağlandığını ortaya koymuşlardır. Yine, farklı buğday çeşidi ile gerçekleştirilen anter kültürü çalışmaları sonucunda, katı besin ortamının, yarı-katı ve sıvı besin ortamlarına göre embriyoid verimi bakımından daha iyi sonuçlar verdiği Engin (1991) tarafından bildirilmiştir.

Kültür ortamında kallus oluşumu üzerinde anterlerin yerleştirme yoğunluğu da etkili olabilmektedir. Kültür ortamında anter yoğunluğunun fazla olması durumunda cansız mikrosporların kültür ortamına toksik maddeler yayabildiği ve bu durumda uygun mikrosporların gelişmesini olumsuz yönde etkileyebileceği Cho ve Zapata (1990) tarafından bildirilmiştir.

Çavdar üzerine yapılan bir çalışmada optimum kültür yoğunluğu için cm^2 'de 1.5-2.0 arasında anter bulunmasının uygun olduğu ortaya konulmuştur (Ma ve ark., 2004).

Besi ortamının pH seviyesi invitroda büyümeyi etkileyebilmektedir. 5.0-6.5 arasında değişen pH derecelerinin in vitro büyüme için uygun olduğu kabul edilmektedir. pH'ın 4.5'dan daha düşük veya 7'den daha büyük olması genellikle invitro büyüme ve gelişmeyi tamamen durdurmaktadır (Hatipoğlu, 1993). Yine besin ortamının anter kültürü için en uygun pH değerinin 5.6-5.8 arasında olması gerektiği değişik araştırmacılar tarafından ileri sürülmüştür (Stamp ve Meredith, 1988; Altamura ve ark., 1992; Salunkhe ve ark., 1999).

Anter kültürü çalışmalarında albino bitkilerin oluşumu tahıllarda önemli bir sorun oluşturmaktadır. Day ve Ellis (1984), ekmeklik buğdayda albimizime kloroplast DNA'sında bozulmanın sebep olduğunu ortaya koymuştur. Yine albimizim sorunu arpa (Jänhe ve ark., 1991) ve ekmeklik buğdayda (Zhou ve ark.,1991; Trottier ve ark., 1993) uygun ortamlar kullanılarak çözümlenmeye çalışılmıştır.

Anter kültüründe diğer bir olumsuzluk, anter dokularından kaynaklanabilecek fenolik bileşikler, büyüme engelleyicileri ve bir takım toksik maddeler mikrospor gelişimini olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Anter kültüründe, kültür sırasında oksidasyon olayı da meydana gelebilmektedir. Oksidasyon olayı, oksijen ile fenolik maddelerin birleşmesi olarak ifade edilebilir ve bitki dokularında kararına meydana getirmektedir. Oksidasyonu engellemek için aktif kömür ortama ilave edilmekte ve böylece besi ortamında oluşan toksik bileşikler absorbe etmekte, böylelikle hücre ve dokuları bu zararlı bileşiklerin etkisinden korumaktadır (Hatipoğlu, 1993). Ayrıca embriyogenesi engelleyen ABA (Absisik asit) absorbe edilerek kültürde başarı

oranı artırılmaktadır (Johansson, 1983). Aktif kömür, aynı zamanda besi ortamlarında önemli olan oksinleri de absorbe edebildiği için, bu durumu da göz önüne alarak ortama konulacak oksin miktarının iyi ayarlanması gerekmektedir (Ellialtıoğlu ve Tııırdamaz, 1997).

Çavdarın anter ve mikrospor kültürleri ile ilişkili olan sorunları; embriyonik kallus oluşumu, düşük bitki rejenerasyonu ve yüksek albino bitki oranı olduğundan, değişik teknikler bu sorunların çözümlenmesine yardımcı olabilmesi için sürekli araştırılmalı ve optimum uygulamalar belirlenmelidir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Araştırmamızda, SDÜ Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü'ne ait araştırma uygulama arazisinde yetiştirilen tetraploid kültür çavdarı (*Secale cereale* L.), ve diploid kültür çavdarı (*Secale cereale* L.) popülasyonuna ait anterler kullanılmıştır. Araştırma, SDÜ'ye ait merkezi doku kültürü laboratuvarında yürütülmüştür.

3.2. Metot

3.2.1. Denemenin Düzenlenmesi

Diploid ve tetraploid kültür çavdarına ait tohumlar 2003 yılı sonbaharında (Ekim-Kasım) 15 günlük aralarla 3 farklı zamanda tarla koşullarına ekilmiştir. 2004 yılı Nisan ayı sonundan itibaren uygun bitkilerin anterleri çalışmada kullanılmıştır. Araştırmada ön işlem uygulaması, ploidi, karbon kaynakları ile hormonların kallus ve haploid bitki oluşumuna etkileri belirlenmeye çalışılmış ve kullanılan modifiye edilmiş N₆ ortamı, Çizelge 3.2.2.1'e göre oluşturulmuştur. Araştırma sonuçları tesadüf parsellerinde faktöriyel deneme desenine göre analiz edilmiştir.

3.2.2. Besin Ortamının Hazırlanması

Modifiye edilmiş N₆ ortamı kallus oluşumunu sağlamak için kallus oluşum ortamı ve gelişme ortamı olarak iki bölümde hazırlanmıştır (Çizelge 3.2.2.1). Ortamda kullanılacak inorganik maddeler ve organik maddelerinin önceden hazırlanmış stok solusyonları kullanılarak besi ortamları hazırlanmış, ardından kullanılacak olan karbon kaynakları (120 g/l maltoz ve 90 g/l sakaroz) (Flehinghaus ve ark., 1991) ve hormonlar (2 mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l kinetin ve 1 mg/l IAA) (Flehinghaus ve ark., 1991; Daniel, 1993) uygun miktarda (Çizelge 3.2.2.2) bu ortama ilave edilmiş ve pH 5.8'e ayarlanmıştır. Daha sonra hazırlanan bu besi ortamlarına katılaştırıcı madde olarak agar, gerekli miktarda (Çizelge 3.2.2.1) ilave edilmiş ve bu ortam iyice

karıştırılıp berrak renk alana kadar kaynatılmıştır. Besi ortamları küçük boy kavanozlara (5 cm çapında) 25 ml olacak şekilde dökülmüş ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlanmıştır. Daha sonra bu kavanozlar steril kabin içerisine konularak ortamın katılaşması beklenmiş ve anterlerin dikimi için hazır hale getirilmiştir.

Çizelge 3.2.2.1. Modifiye edilmiş N₆ ortamında kallus oluşum ortamı ve gelişme ortamının içeriği

| Kimyasal Maddeler | Kallus Oluşum Ortamı | Gelişme Ortamı |
|---|----------------------|----------------|
|mg/l..... | | |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 463.00 | 231.50 |
| KNO ₃ | 2830.00 | 1415.00 |
| KH ₂ PO ₄ | 400.00 | 200.00 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 185.00 | 92.50 |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 166.00 | 83.00 |
| MnSO ₄ .4H ₂ O | 4.40 | 2.20 |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 1.50 | 0.75 |
| H ₃ BO ₃ | 1.60 | 0.80 |
| KI | 0.80 | 0.40 |
| FeNa ₂ EDTA.2H ₂ O | 40.00 | 40.00 |
| Glycine | 2.00 | 2.00 |
| Glutamine | 160.00 | 320.00 |
| Thiamine HCl | 1.00 | 1.00 |
| Pyridoxine HCl | 0.50 | 0.50 |
| Nicotinic acid | 0.50 | 0.50 |
| 2,4-D | # | - |
| Kinetin | # | 2.00 |
| IAA | # | - |
|g/l..... | | |
| Sakkoroz | # | 20.00 |
| Maltoz | # | - |
| Agar | 5.00 | 5.00 |
| Aktive edilmiş karbon | - | 2.00 |
| PH | 5.8 | 5.8 |

Çizelge 3.2.2.2'e göre konsantrasyonlar kullanılacaktır.

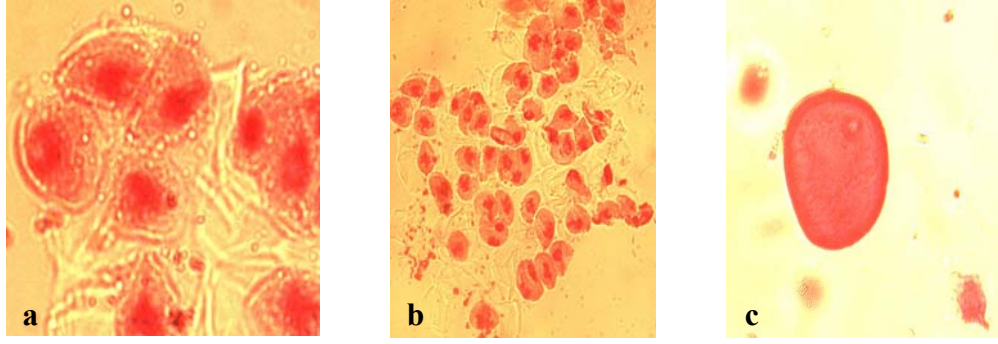
Çizelge 3.2.2.2 Ploidi seviyeleri ve karbon kaynaklarına (maltoz ve sakaroz) göre IAA, 2,4-D ve kinetinin konsantrasyonları

| Ploidi | Karbon Kaynağı Konsantrasyonları (g/l) | Hormon Konsantrasyonları (mg/l) |
|---|--|---------------------------------|
| Diploid Kültür Çavdarı (<i>Secale cereale</i> L.) | Maltoz (120 g/l) | 2,4-D (2 mg/l) |
| | | Kinetin (0.5 mg/l) |
| | | IAA (1 mg/l) |
| | Sakaroz (90 g/l) | 2,4-D (2 mg/l) |
| | | Kinetin (0.5 mg/l) |
| | | IAA (1 mg/l) |
| Tetraploid Kültür Çavdarı (<i>Secale cereale</i> L.) | Maltoz (120 g/l) | 2,4-D (2 mg/l) |
| | | Kinetin (0.5 mg/l) |
| | | IAA (1 mg/l) |
| | Sakaroz (90 g/l) | 2,4-D (2 mg/l) |
| | | Kinetin (0.5 mg/l) |
| | | IAA (1 mg/l) |

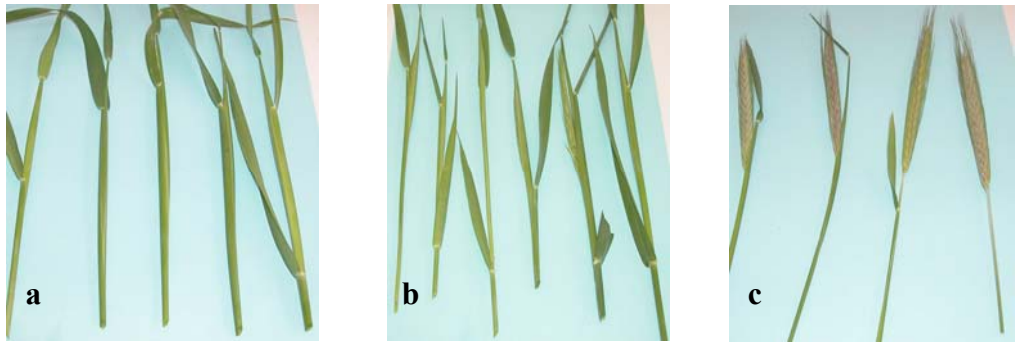
3.2.3. Anterlerin Alınması ve Ön İşlem Uygulaması

Anter kültürü çalışmalarında başarı oranını etkileyen en önemli faktörlerden birisi, donör bitkinin mikrospor gelişim safhasıdır. Bu nedenle kültüre alma işlemlerinden önce sitolojik incelemelerle anterlerde tek çekirdekli mikrospor dönemi belirlenmeye çalışılmıştır. Sitolojik incelemelerde asetokarmin tekniği kullanılmıştır (Immonen ve Anttila, 1998). Karınlanmadan itibaren her gün başak örnekleri alınarak tek çekirdekli dönemin yaklaşık olarak başakların morfolojik tanımlaması yapılmaya çalışılmıştır (Şekil 3.2.3.1; Şekil 3.2.3.2 ve Şekil 3.2.3.3). Başakların orta kısımlarında bulunan başakçık içerisindeki anterlerin alınmasına özen gösterilmiştir

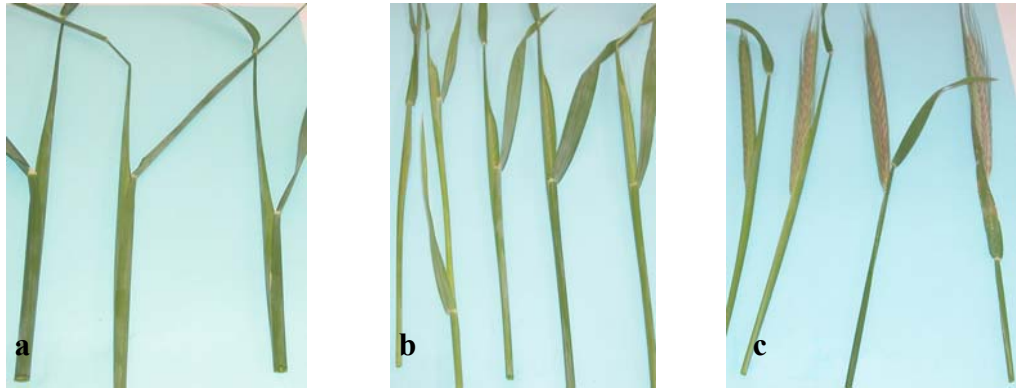
Her genotipten uygun dönemdeki başak örnekleri alınmıştır. Bu başak örneklerinin yarısı doğrudan kültür ortamına konulmuştur. Diğer yarısı, içerisinde su bulunan cam kavanozlarda +4 °C'de 1 hafta karanlıkta soğuk işlemine tabi tutulmuştur (Immonen, 1999). Örnek başaklar saplı olarak alınmış ve bayrak yaprak hariç diğer yaprak aksamları uzaklaştırılmıştır (Immonen ve Anttila, 1999).



Şekil 3.2.3.1. Mikrospor gelişme evreleri (a-tetrad dönemi-erken dönem, b-geç tetrad dönemi-uygun dönem, c-tek çekirdekli dönem-uygun dönem)



Şekil 3.2.3.2. Diploid çavdarın başak dönemleri (a-erken başak dönemi, b-uygun başak dönemi, c-geç başak dönemi)



Şekil 3.2.3.3. Tetraploid çavdarın başak dönemleri (a-erken başak dönemi, b-uygun başak dönemi, c-geç başak dönemi)

3.2.4. Anterlerin Sterilizasyonu

Farklı uygulamalara tabii tutulan örnek başaklar, saf su ile yıkandıktan sonra yüzey sterilizasyonu için steril kabin içerisinde % 0.5 polyoxyethylenesorbitan monooleate

(Tween 80) içeren % 1.2'lik sodyum hypoklorit çözeltisinde 20 dakika süre ile steril edilmiştir (Immonen, 1999). Daha sonra 5 kez steril saf su içinde yıkanan başaklardan izole edilen anterler, anter kültürü çalışmaları için hazır hale getirilmiştir.

3.2.5. Anterlerin Besin Ortamına Alınması

Kallus oluşumunun sağlanması amacıyla kallus oluşum ortamında her uygulama için 20 tekerrür oluşturulmuştur. Anterler, içerisinde 25 ml besin ortamı bulunan küçük kavanozlarda (5 cm çapında) kültüre alınmıştır (Şekil 3.2.5.1).



Şekil 3.2.5.1. Anterlerin dikim aşamasında çıkarılması

Kallus oluşum ortamı için her uygulamada küçük kavanozlara 10'ar adet anter konulmuştur ($20 \times 10 = 200$ adet anter). Modifiye edilmiş N_6 ortamında her genotip için 240 adet (2 ön işlem x 20 tekerrür x 2 karbon kaynağı x 3 hormon) olmak üzere toplam 480 kavanoz kullanılmıştır.

Tüm uygulamalarda, anterler karanlıkta 4 hafta tutulmuş ve daha sonra aydınlık ortama taşınmıştır. Kalluslar, gelişme durumlarına göre 12-14 hafta bu ortamda tutulduktan sonra anterlerin kallus oluşturabilme yetenekleri değerlendirilmiş ve oluşan bu kalluslar cam deney tüplerinde (14 cm boy, 2.5 cm çap) alt kültüre alınmıştır (Şekil 3.2.5.2). Alt kültürler 3 gün karanlıkta tutulduktan (Flehinghaus ve

ark., 1991) sonra gündüz/gece fotoperiyodunda 4-5 ay arasında tutulmuştur. Kök oluşturan ve gelişen bitkicikler, içerisinde 1:1 oranında steril torf ve perlit karışımı bulunan saksılara aktarılmış, bununla beraber bitkiciklerin sarsıntı geçirmemesi için dış koşullara alıştıranak üzerleri naylon torba ile kapatılmış, günde iki defa havalandırarak bu işlem 5-6 gün tekrarlanmış bir hafta sonra torbalar tamamen kaldırılmıştır.



Şekil 3.2.5.2. Steril kabinde alt kültüre alma işlemleri

3.2.6. Kültür Koşulları

Fotoperiyot: Tetraploid ve diploid kültür çavdarlarının alındığı kültür kapları, kallus oluşumu için 4 hafta (Gürel ve ark., 1993) ve alt kültürler için ilk 3 gün karanlık koşullarda bırakılmışlardır (Flehinghaus ve ark., 1991). Bunun dışındaki bütün kültürlerde 16 saat aydınlık- 8 saat karanlık fotoperiyot uygulanmıştır (Gürel, 1994; Immonen ve Anttila, 1998).

Aydınlatma: Laboratuvar koşullarında flouresan lambalar ile sağlanmış ve aydınlatma 2000-2200 lux arasında değişmiştir (Gürel ve ark., 1993).

Sıcaklık: Kallus oluşumu için karanlık koşullarda kültürler 25 °C’de tutulmuş, alt kültürlerin karanlıktaki ilk 3 günlük kültür sıcaklığı 27 °C olmuş daha sonraki aydınlık-karanlık koşullarındaki sıcaklık 22 °C’ye düşürülmüştür. (Flehinghaus ve ark., 1991). Araştırmamızda kullanılan gelişme odası Şekil 3.2.6.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3.2.6.1. Gelişme odasının genel görünüşü

3.2.7. Araştırmada İncelenen Konular

Denemede ele alınan faktörlerin, başlangıç ortamında anter reaksiyon oranı ve rejenerasyon oranı üzerine etkileri belirlenmiştir. Yöntem bölümünde belirtilen süre sonunda her bir anterin kallus oluşturabilme yeteneği ve bu kalluslardan meydana gelen albino ve yeşil embriyoidlerin oranı %'de olarak belirlenmeye çalışılmıştır. Ayrıca uygulamalara göre meydana gelen bitkiciklerin kromozom sayıları tespit edilmeye çalışılmıştır. Rejenerantların kök ucu kromozomlarının incelenmesinde Feulgen boyama metodunu kullanılmıştır (Sağsöz ve ark., 1997).

3.2.8. Verilerin İstatistiksel Analizi

Araştırma, tesadüf parsellerinde faktöriyel deneme desenine göre düzenlenmiş ve elde edilen veriler bilgisayarda MSTAT-C paket programı kullanılarak analiz edilmiştir. Önemli bulunan farklılıkların, LSD veya Duncan çoklu karşılaştırma testi ile kontrolü yapılmıştır. Anter tepki oranı ve kallus oranına açılı transformasyonu uygulanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Tepki Gösteren Anter Oranı

Tepki gösteren anter oranını belirlemede, gelişme gösteripte kallus oluşturmayan ve kallus oluşturmuş anterler kriter olarak ele alınmıştır (Şekil 4.1.1).



Şekil 4.1.1. Kùltür ortamında anterlerin gelişimi (a-kallus oluşturanlar, b-gelişmiş ancak kallus oluşturmayanlar, c-gelişme göstermeyenler)

Tepki gösteren anter oranına ait varyans analiz sonuçları Çizelge 4.1.1 ve incelenen faktörlerin anter tepki oranına (%) ait değerleri Çizelge 4.1.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1.1. Çavdarda (*S. cereale*) tepki gösteren anter oranına ait varyans analiz sonuçları

| Varyasyon Kaynakları | Serbestlik Derecesi | Tepki Gösteren Anter Oranı F Değerleri |
|----------------------|---------------------|--|
| Ön işlem (1) | 1 | 103.6345** |
| Ploidi (2) | 1 | 3.4987 |
| Karbon (3) | 1 | 78.6060** |
| Hormon (4) | 2 | 4.1512** |
| 1x2 | 1 | 49.4409** |
| 1x3 | 1 | 3.2359 |
| 1x4 | 2 | 3.7995* |
| 2x3 | 1 | 20.2550** |
| 2x4 | 2 | 6.5279** |
| 3x4 | 2 | 12.8833** |
| 1x2x3 | 1 | 1.1698 |
| 1x2x4 | 2 | 0.8816 |
| 1x3x4 | 2 | 23.2332** |
| 2x3x4 | 2 | 9.0021** |
| 1x2x3x4 | 2 | 8.5898** |
| Hata | 456 | |
| Genel | 479 | |

* %5, ** % 1 seviyesinde önemlidir.

Ön işlemin etkisi

Anter tepki oranı üzerine ön işlemin etkisi önemli ($p < 0.01$) bulunmuştur (Çizelge 4.1.1). Ele alınan faktörlerin genel ortalaması olarak +4 °C’de 1 hafta süre ile başakların karanlık bir ortamda tutulması kültür ortamına konulan anterlerin tepki oranını azaltmıştır. Nitekim soğuk uygulamasında anter tepki oranı % 63.72 iken, ön işlem yapılmayanlarda % 76.74 olarak belirlenmiştir (Şekil.4.1.2).

Ploidinin etkisi

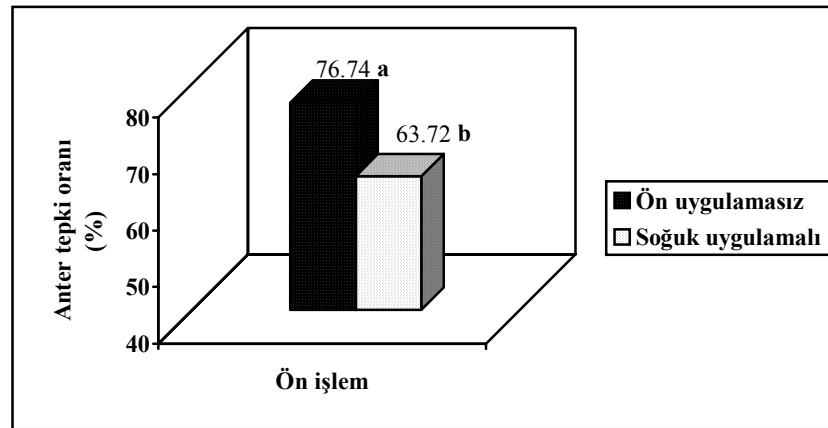
Tepki gösteren anter sayısı üzerine ploidin etkisi önemli olmamıştır (Çizelge 4.1.1). Ancak diploidlerde anter tepki oranı daha yüksek bulunmuştur. Tüm varyantların ortalaması olarak diploidlerde anter tepki oranı % 71.42 tetraploidlerde ise % 69.03 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1.3).

Çizelge 4.1.2. Çavdarda (*S. cereale*) ön işlem, ploidi, karbon kaynağı ve hormon uygulamalarında anter tepki oranları (%)

| Ön İşlem | Ploidi Seviyesi | Karbon Kaynağı | Hormon | | | | | | Ortalama | | Genel Ortalama | |
|------------------|-----------------|----------------|--------------|--------------------|--------------|--------------------|--------------|--------------------|----------|--------------------|----------------|--------------------|
| | | | 2,4-D | | Kinetin | | IAA | | | | | |
| Ön Uygulamasız | Diploid | Maltoz | 80.00 | 76.05 ¹ | 76.00 | 73.46 ¹ | 48.00 | 50.68 ¹ | 68.00 | 66.73 ¹ | 81.08 | 76.74 ¹ |
| | | Sakaroz | 78.00 | 73.86 | 83.00 | 77.50 | 94.00 | 89.08 | 85.00 | 80.15 | | |
| | Ortalama | | 79.00 | 74.96 | 79.50 | 75.48 | 71.00 | 69.88 | | | | |
| | Tetraploid | Maltoz | 87.50 | 81.81 | 87.50 | 81.74 | 73.00 | 69.57 | 82.67 | 77.71 | | |
| | | Sakaroz | 91.00 | 84.58 | 77.50 | 72.55 | 97.50 | 90.00 | 88.67 | 82.38 | | |
| | Ortalama | | 89.25 | 83.20 | 82.50 | 77.15 | 85.25 | 79.79 | | | | |
| Soğuk Uygulamalı | Diploid | Maltoz | 65.50 | 62.72 | 59.50 | 60.44 | 53.50 | 53.89 | 59.50 | 59.02 | 65.58 | 63.72 |
| | | Sakaroz | 89.00 | 81.18 | 81.00 | 75.94 | 87.00 | 82.28 | 85.67 | 79.80 | | |
| | Ortalama | | 77.25 | 71.95 | 70.25 | 68.19 | 70.25 | 68.09 | | | | |
| | Tetraploid | Maltoz | 60.00 | 59.14 | 27.00 | 37.15 | 72.00 | 68.01 | 53.00 | 54.77 | | |
| | | Sakaroz | 62.00 | 58.80 | 66.50 | 63.64 | 64.00 | 61.38 | 64.17 | 61.27 | | |
| | Ortalama | | 61.00 | 58.97 | 46.75 | 50.40 | 68.00 | 64.70 | | | | |

Ortalamalar arasındaki çoklu karşılaştırmalar şekil ve çizelgelerde ayrıca verilmiştir.

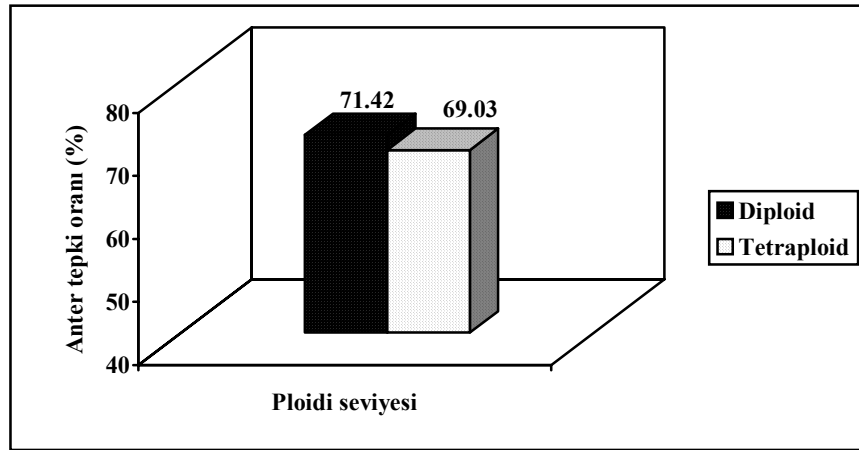
1: Transforme olmuş değerler.



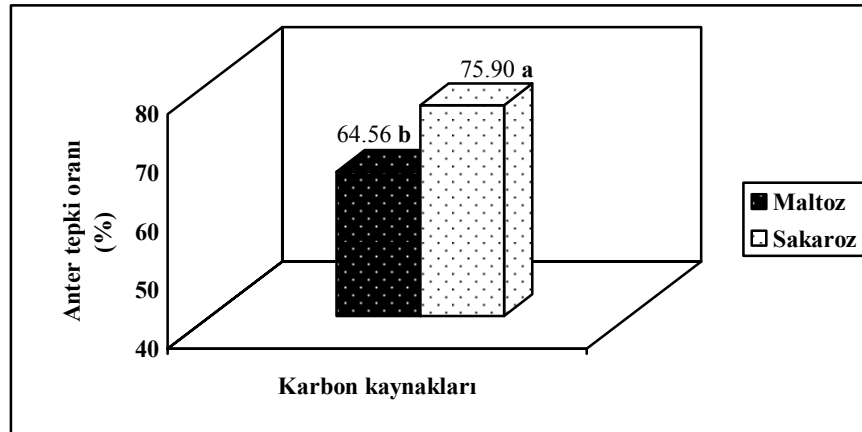
Şekil 4.1.2. Anter tepki oranına ön işlemin etkisi

Karbon kaynaklarının etkisi

Anter tepki oranı üzerine karbon kaynaklarının etkisi istatistiki olarak önemli ($p < 0.01$) bulunmuştur (Çizelge 4.1.1). Karbon kaynağı olarak maltoz kullanıldığında anter tepki oranı daha düşük olmuştur. Nitekim karbon kaynağına göre anter tepki oranı maltozda % 64.56 sakarozda % 75.90 olarak belirlenmiştir (Şekil.4.1.4).



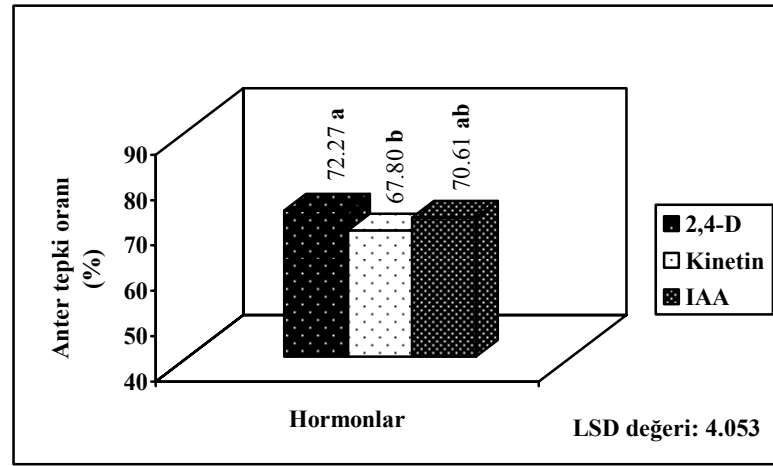
Şekil 4.1.3. Anter tepki oranına ploidin etkisi



Şekil 4.1.4. Anter tepki oranına karbon kaynaklarının etkisi

Hormonların etkisi

Araştırmada 3 farklı hormonun (2,4-D, kinetin ve IAA) anter tepkileri üzerine etkileri incelendiğinde, en yüksek tepki oranı 2,4-D uygulamasından (% 72.27) elde edilmiş olup, bunu IAA (% 70.61) ve kinetin (% 67.80) izlemiştir (Şekil 4.1.5). Araştırmada kullanılan hormonların anter tepki oranına etkisi önemli ($p < 0.01$) bulunmuştur (Çizelge 4.1.1). Ancak 2,4-D ve IAA uygulamasından elde edilen anter tepki oranları arasındaki fark önemli olmamıştır. Aynı şekilde kinetin ve IAA uygulamasında anter tepki oranları sayısal olarak farklı olmasına rağmen bu fark önemli bulunmamıştır.



Şekil 4.1.5. Anter tepki oranına hormonların etkisi

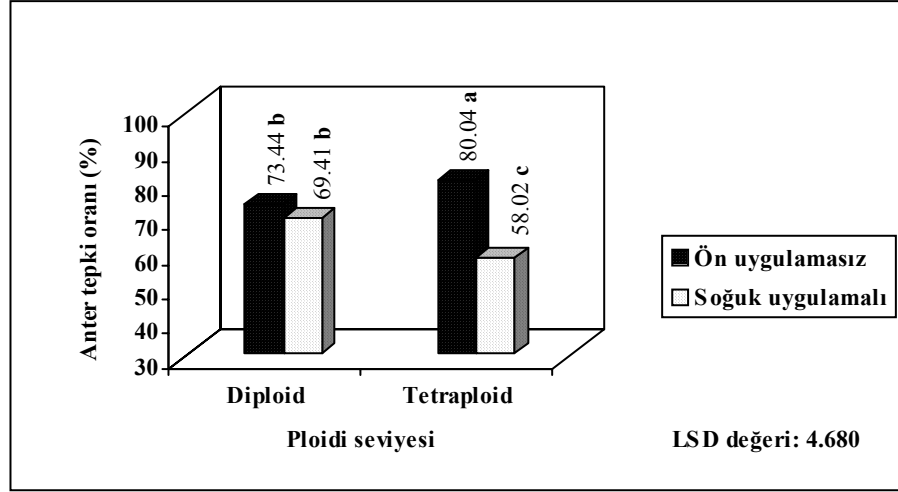
Faktörlerin interaksyonu

Çavdarda ön işlem ve ploidi seviyesi arasındaki interaksyon önemli ($p < 0.01$) bulunmuştur (Çizelge 4.1.1). Doğrudan kültür ortamına aktarılan anterlerde tetraploidlerde tepki oranı daha yüksek olduğu halde (% 80.04) ön işlem uygulandığında bu oran önemli derecede (% 58.02) düşmüştür. Diploidlerde başaklara kültürden önce ön işlem uygulanıp uygulanmaması anter tepki oranında istatistiksel olarak fark yaratmamıştır. Ancak tetraploidlerde soğuk uygulama yapılması anter tepki oranının % 80.04'den % 58.02'ye düşmesine neden olmuş ve istatistiksel olarak önemli derecede farklılık gözlenmiştir.(Şekil 4.1.6)

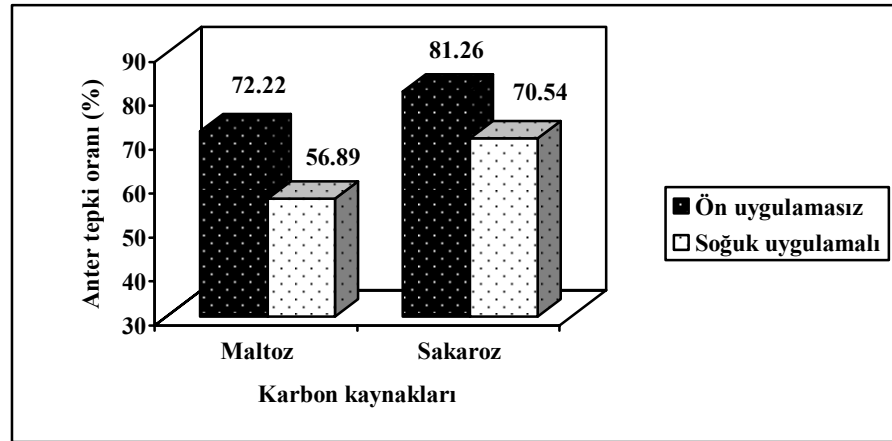
Denemede, ön işlem x karbon kaynakları interaksyonu önemsiz olmakla birlikte (Çizelge 4.1.1) anter tepki oranı ön uygulamasız sakarozda en yüksek, soğuk uygulamalı maltoz kullanımında ise en düşük olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1.7).

Ön işlem x hormon interaksyonu istatistiksel olarak önemli ($p < 0,05$) bulunmuş (Çizelge 4.1.1) ve anter tepki oranları % 59.29-79.08 arasında değişmiştir. Genel olarak ön işlem uygulanmayanlarda her 3 hormon içinde anter tepki oranları daha yüksek bulunmuş ve bu oranlar, 2,4-D uygulamasında % 79.08, kinetin uygulamasında % 76.31 ve IAA uygulamasında % 74.83 olarak belirlenmiştir. Ön işlem yapılmamış uygulamalarda kullanılan hormonların tümünde anter tepki oranı yönünden farklılık bulunmamıştır. Soğuk uygulama yapılanlarda ise kinetinden elde

edilen anter tepki oranı önemli seviyede diğerlerinden düşük bulunmuştur (Şekil 4.1.8).

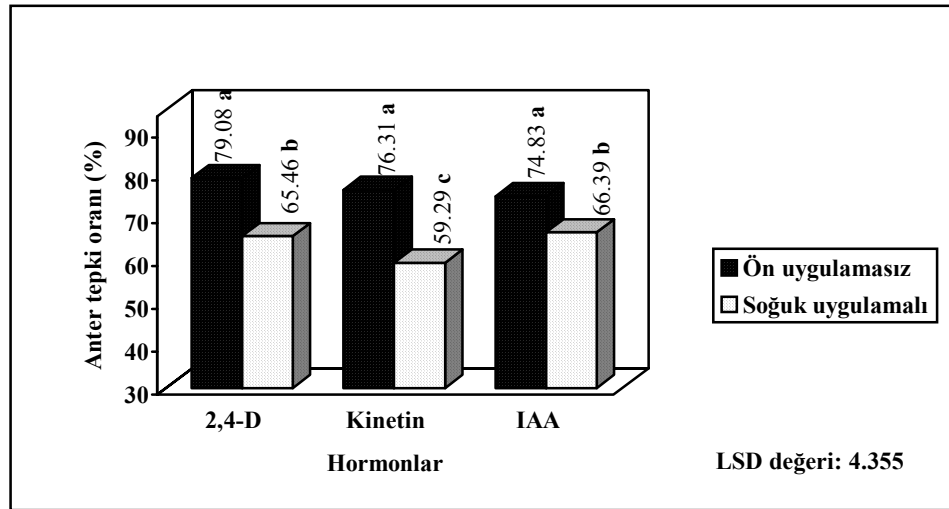


Şekil 4.1.6. Anter tepki oranına ön işlem x ploidi interaksiyonunun etkisi

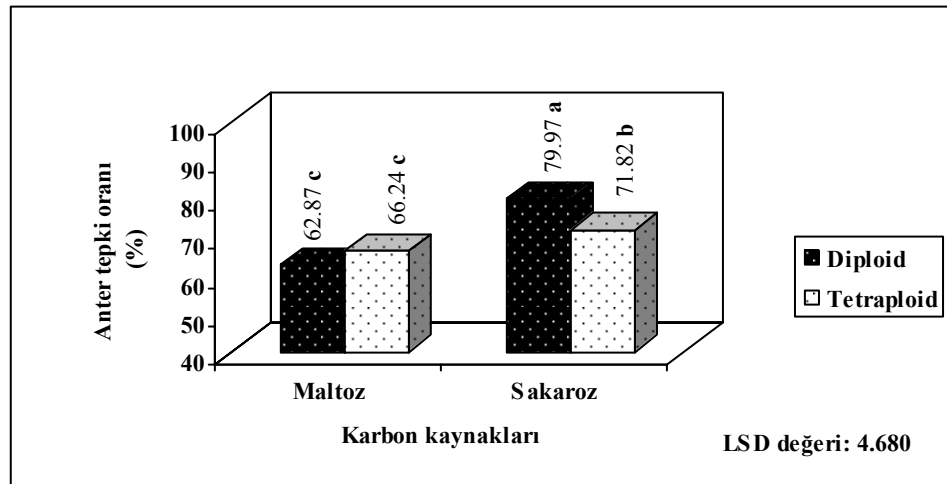


Şekil 4.1.7. Anter tepki oranına ön işlem x karbon kaynakları interaksiyonunun etkisi

Denemede faktör olarak kullanılan ploidi x karbon kaynakları interaksiyonu önemli ($p < 0.01$) bulunmuştur (Çizelge 4.1.1). En yüksek anter tepki oranı diploid ve tetraploidlerde sakaroz uygulamasından elde edilmiştir (sırasıyla % 79.97 ve % 71.82). Diploid ve tetraploidlerde maltoz kullanımı anter tepki oranında benzer sonuçları vermiş ve bu gruplar arasında farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4.1.9).

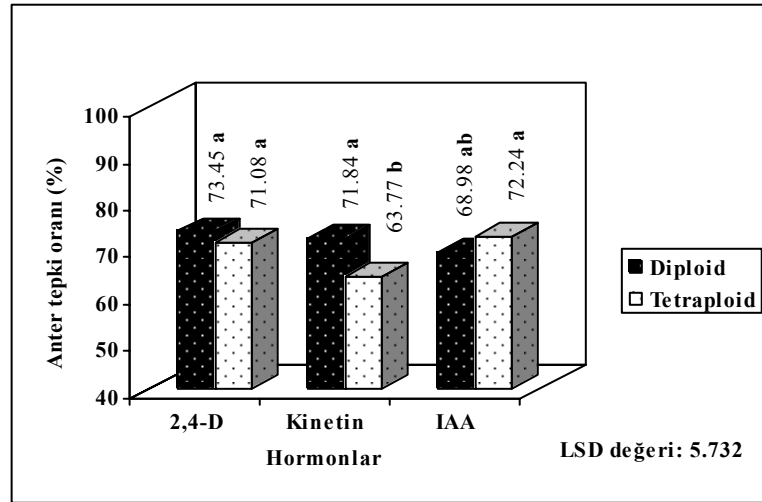


Şekil 4.1.8. Anter tepki oranına ön işlem x hormon interaksiyonunun etkisi



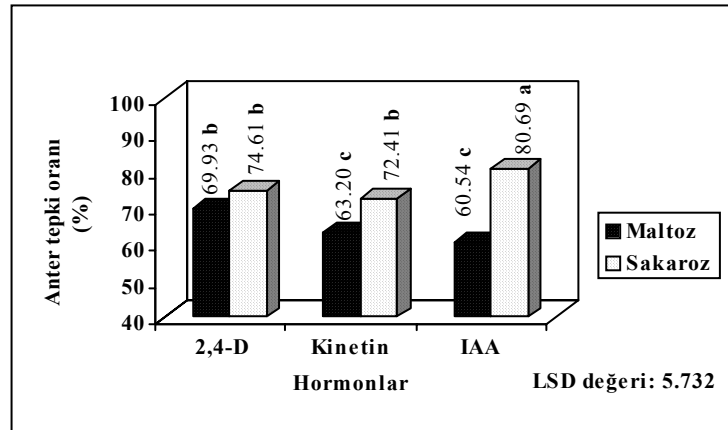
Şekil 4.1.9. Anter tepki oranına ploidi x karbon kaynakları interaksiyonunun etkisi

Ploidi seviyesine göre hormon uygulamalarının anter tepki oranına etkisi, istatistiksel olarak önemli ($p < 0.01$) seviyede değişiklik göstermiş (Çizelge 4.1.1) ve en düşük anter tepki oranı tetraploidlerde kinetin uygulamasında, diploidlerde ise IAA uygulamasında tespit edilmiştir. Diploid çavdarda hormonlar arasındaki farklılık önemli bulunmaz iken, tetraploidlerde kinetin uygulamasında anter tepki oranı önemli seviyede düşük bulunmuştur (Şekil 4.1.10).



Şekil 4.1.10. Anter tepki oranına ploidi x hormon etkileşiminin etkisi

Yine karbon kaynakları x hormon etkileşimi istatistiksel olarak önemli ($p < 0.01$) bulunmuş (Çizelge 4.1.1) ve anter tepki oranları %60.54-80.69 arasında değişmiştir. Genel olarak sakaroz uygulamasında denemede kullanılan tüm hormonlarda anter tepki oranı maltoza göre daha yüksek olmuştur (Şekil 4.1.11.).



Şekil 4.1.11. Anter tepki oranına karbon kaynakları x hormon etkileşiminin etkisi

Denemede ele alınan faktörlerin üçlü etkileşimleri değerlendirildiğinde ön işlem x ploidi x karbon kaynakları etkileşimi istatistiksel olarak önemsiz (Çizelge 4.1.1) olmakla birlikte anter tepki oranı % 54.77-82.38 arasında değişmiştir (Çizelge 4.1.2).

Yine ön işlem x ploidi x hormon arasındaki interaksiyon istatistiksel olarak önemsiz bulunmuş (Çizelge 4.1.1) ve anter tepki oranları % 50.40-83.20 arasında değişmiştir (Çizelge 4.1.2).

Ön işlem x karbon kaynakları x hormon arasındaki interaksiyon istatistiksel olarak çok önemli ($p < 0.01$) bulunmuştur (Çizelge 4.1.1). En düşük anter tepki oranı soğuk uygulamalı, maltoz ve kinetin uygulamasından elde edilmiş, en yüksek ise ön uygulamasız sakaroz ve IAA uygulamasından elde edilmiştir (% 89.54). Ön işlem x hormon interaksiyonuna baktığımızda ön uygulamasız ve 2,4-D uygulaması en yüksek anter tepki oranını vermesine rağmen, bu durum üçlü interaksiyonda IAA'de belirlenmiştir. Anter tepki oranında 2,4-D'nin ön uygulamasız tüm etkileşimlerinde farklılık gözlemlenmemiştir. Ancak IAA, ön işlem uygulaması ve karbon kaynağına göre önemli farklılıklar gözlenmiştir. (Çizelge 4.1.3).

Çizelge 4.1.3. Anter tepki oranına ön işlem x karbon kaynakları x hormon interaksiyonunun etkisi

| Ön İşlem | Karbon Kaynakları | Hormon | Anter Tepki Oranı (%) | |
|--------------------------|-------------------|---------|-----------------------|----------------------|
| Ön uygulamasız | Maltoz | 2,4-D | 83.75 | 78.93 ¹ b |
| | | Kinetin | 81.75 | 77.60 bc |
| | | IAA | 60.50 | 60.12 d |
| | Sakaroz | 2,4-D | 84.50 | 79.22 b |
| | | Kinetin | 80.25 | 75.02 bc |
| | | IAA | 95.75 | 89.54 a |
| Soğuk uygulamalı | Maltoz | 2,4-D | 62.75 | 60.93 d |
| | | Kinetin | 43.25 | 48.80 e |
| | | IAA | 62.75 | 60.95 d |
| | Sakaroz | 2,4-D | 75.50 | 69.99 c |
| | | Kinetin | 73.75 | 69.79 c |
| | | IAA | 75.50 | 71.83 bc |
| LSD değeri: 8.106 | | | | |

1: Transforme olmuş değerler.

Ploidi x karbon kaynakları x hormon interaksiyonu incelendiğinde, anter tepki oranına etkisi önemli ($p < 0.01$) olmuştur (Çizelge 4.1.1). Anter tepki oranı % 52.28-85.68 arasında değişmiştir. En yüksek anter tepki oranı, diploid kültür çavdarına ait anterlerin sakaroz ve IAA içeren ortamda kültüre alınması ile elde edilmiş (% 85.68) ancak bu durum diğer ploidi seviyesinde (tetraploid) önemli seviyede azalmıştır (% 52.28).

75.69). 2,4-D'nin ploidi ve karbon kaynakları ile etkileşimi sonucunda elde edilen anter tepki oranları yönünden farklılık oluşmamıştır. (Çizelge 4.1.4).

Çizelge 4.1.4. Anter tepki oranına ploidi x karbon kaynakları x hormon etkisi

| Ploidi Seviyesi | Karbon Kaynakları | Hormon | Anter Tepki Oranı (%) | |
|--------------------------|-------------------|---------|-----------------------|------------------------|
| Diploid | Maltoz | 2,4-D | 72.75 | 69.38 ¹ b-d |
| | | Kinetin | 67.75 | 66.95 de |
| | | IAA | 50.75 | 52.28 f |
| | Sakaroz | 2,4-D | 83.50 | 77.52 b |
| | | Kinetin | 82.00 | 76.72 bc |
| | | IAA | 90.50 | 85.68 a |
| Tetraploid | Maltoz | 2,4-D | 73.75 | 70.48 b-d |
| | | Kinetin | 57.25 | 59.45 ef |
| | | IAA | 72.50 | 68.79 b-d |
| | Sakaroz | 2,4-D | 76.50 | 71.69 b-d |
| | | Kinetin | 72.00 | 68.09 cd |
| | | IAA | 80.75 | 75.69 b-d |
| LSD değeri: 8.106 | | | | |

1: Transforme olmuş değerler.

Tüm faktörlerin birbirleriyle olan etkileşimi istatistiksel olarak önemli ($p < 0.01$) bulunmuştur (Çizelge 4.1.1). En yüksek anter tepki oranı, tetraploidlerde sakaroz ve IAA kullanılan ortamdan elde edilmiştir. Araştırmada anter tepki oranı üzerine ele alınan faktörlerin genel olarak değerlendirilmesi yapıldığında, 2,4-D'nin uygulanan işlemlerden daha az etkilendiği ve özellikle soğuk ön işlem uygulaması yapıldığında hormonların etkisinin önemli seviyede değişebildiği söylenebilir (Çizelge 4.1.5).

4.2. Kallus Oranı

Anterlerin kültüre alınmalarından sonra 2-3 haftadan itibaren anterlerin şişip patladığı özellikle bu reaksiyonun diploidlerde daha önce başladığı yapılan gözlemlerde belirlenmiştir.

Kültür ortamındaki anterlerin karanlık ortamdan alındıktan sonra bazı anterlerin patlayıp gelişmeden kaldıkları bazılarının sert embriyonik yapıda bazılarının ise sulu embriyonik olmayan yapıda oldukları gözlenmiş ve sulu yapıda olanlar gelişme

ortamına aktarılmamışlar ve bu tip hücre yığınlarında genellikle kısa sürede bozulma meydana gelmiştir. Sert hücre yığınları şeklinde olan kalluslar daha sonra gelişme ortamına aktarılmıştır.

Çizelge 4.1.5. Anter tepki oranına ön işlem x ploidi x karbon kaynakları x hormon etkisi

| Ön İşlem | Ploidi Seviyesi | Karbon Kaynakları | Hormon | Anter Tepki Oranı (%) | |
|--------------------------|-----------------|-------------------|---------|-----------------------|------------------------|
| | | | | | |
| Ön uygulamasız | Diploid | Maltoz | 2,4-D | 80.00 | 76.05 ¹ c-f |
| | | | Kinetin | 76.00 | 73.46 c-h |
| | | | IAA | 48.00 | 50.68 j |
| | | Sakaroza | 2,4-D | 78.00 | 73.86 c-g |
| | | | Kinetin | 83.00 | 77.50 a-e |
| | | | IAA | 94.00 | 89.08 ab |
| | Tetraploid | Maltoz | 2,4-D | 87.50 | 81.81 a-d |
| | | | Kinetin | 87.50 | 81.74 a-d |
| | | | IAA | 73.00 | 69.57 d-ı |
| | | Sakaroza | 2,4-D | 91.00 | 84.58 a-c |
| | | | Kinetin | 77.50 | 72.55 c-h |
| | | | IAA | 97.50 | 90.00 a |
| Soğuk uygulamalı | Diploid | Maltoz | 2,4-D | 65.50 | 62.72 g-j |
| | | | Kinetin | 59.50 | 60.44 h-j |
| | | | IAA | 53.50 | 53.89 j |
| | | Sakaroza | 2,4-D | 89.00 | 81.18 a-d |
| | | | Kinetin | 81.00 | 75.94 b-f |
| | | | IAA | 87.00 | 82.28 a-d |
| | Tetraploid | Maltoz | 2,4-D | 60.00 | 59.14 ıj |
| | | | Kinetin | 27.00 | 37.15 k |
| | | | IAA | 72.00 | 68.01 e-ı |
| | | Sakaroza | 2,4-D | 62.00 | 58.80 ıj |
| | | | Kinetin | 66.50 | 63.64 f-j |
| | | | IAA | 64.00 | 61.38 g-j |
| LSD değeri: 11.46 | | | | | |

1: Transforme olmuş değerler.

Kallus oranının belirlenmesinde embriyonik kalluslar değerlendirilmiştir. Uygulanan faktörlere göre sulu kallus oranı % 0.00-21.33 arasında değişmiştir. Genel olarak soğuk uygulaması kallus oluşumunu arttırdığı gibi, sulu kallus oranını da arttırmıştır (Soğuk uygulandığında % 10.87, uygulanmadığında % 8.29). Ploidi seviyeleri incelendiğinde bu tip kallus oranı diploidlerde (% 10.10) tetraploidlerden (%9.06) daha yüksek bulunmuştur. Yine yüksek oranda, sakarozda (% 9.79) ve 2,4-D uygulamasında (% 9.86) sulu kallus tespit edilmiştir.

Kallus oranına ait verilerin varyans analiz sonuçları Çizelge 4.2.1 ve incelenen faktörlerin kallus oranına etkisi Çizelge 4.2.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2.1. Çavdarda (*S. cereale*) kallus oranına ait varyans analiz sonuçları

| Varyasyon Kaynakları | Serbestlik Derecesi | Kallus Oranı F Değerleri |
|----------------------|---------------------|--------------------------|
| Ön İşlem (1) | 1 | 13.0747** |
| Ploidi (2) | 1 | 6.3375** |
| Karbon (3) | 1 | 4.3533* |
| Hormon (4) | 2 | 2.5294 |
| 1x2 | 1 | 0.0082 |
| 1x3 | 1 | 2.1505 |
| 1x4 | 2 | 7.1214** |
| 2x3 | 1 | 1.1288 |
| 2x4 | 2 | 1.5175 |
| 3x4 | 2 | 1.9101 |
| 1x2x3 | 1 | 1.6366 |
| 1x2x4 | 2 | 0.9635 |
| 1x3x4 | 2 | 2.1983 |
| 2x3x4 | 2 | 1.9727 |
| 1x2x3x4 | 2 | 5.0153** |
| Hata | 456 | |
| Genel | 479 | |

* %5, ** %1 seviyesinde önemlidir.

Çizelge 4.2.2. Çavdar (*S. cereale*)’da ön işlem, ploidi, karbon kaynakları ve hormon uygulamalarında kallus oranları (%)

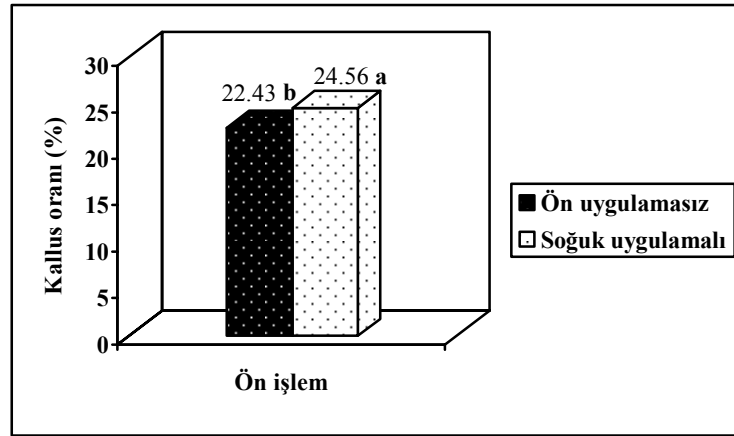
| Ön İşlem | Ploidi Seviyesi | Karbon Kaynağı | Hormon | | | | | | Ortalama | | Genel Ortalama | |
|-----------------------|-----------------|----------------|--------------|--------------------|--------------|--------------------|--------------|--------------------|----------|--------------------|----------------|--------------------|
| | | | 2,4-D | | Kinetin | | IAA | | | | | |
| Ön Uygulama-sız | Diploid | Maltoz | 13.00 | 20.87 ¹ | 13.50 | 21.28 ¹ | 16.50 | 23.57 ¹ | 14.33 | 21.91 ¹ | 15.04 | 22.43 ¹ |
| | | Sakaroz | 14.00 | 21.69 | 13.00 | 20.87 | 14.00 | 21.69 | 13.67 | 21.42 | | |
| | Ortalama | 13.50 | 21.28 | 13.25 | 21.08 | 15.25 | 22.63 | | | | | |
| | Tetraploid | Maltoz | 14.50 | 22.02 | 17.50 | 24.03 | 17.00 | 23.90 | 16.33 | 23.32 | | |
| | | Sakaroz | 13.50 | 21.28 | 15.50 | 22.91 | 18.50 | 25.05 | 15.83 | 23.08 | | |
| | Ortalama | 14.00 | 21.65 | 16.50 | 23.47 | 17.75 | 24.48 | | | | | |
| Soğuk Uygulama-lı | Diploid | Maltoz | 22.00 | 26.40 | 17.00 | 23.77 | 15.50 | 22.43 | 18.17 | 24.20 | 18.33 | 24.56 |
| | | Sakaroz | 21.50 | 26.83 | 14.00 | 21.69 | 14.50 | 21.95 | 16.67 | 23.49 | | |
| | Ortalama | 21.75 | 26.62 | 15.50 | 22.73 | 15.00 | 22.19 | | | | | |
| | Tetraploid | Maltoz | 23.50 | 28.32 | 14.00 | 21.69 | 28.00 | 31.01 | 21.83 | 27.01 | | |
| | | Sakaroz | 19.00 | 25.39 | 18.00 | 24.36 | 13.00 | 20.87 | 16.67 | 23.54 | | |
| | Ortalama | 21.25 | 26.85 | 16.00 | 23.02 | 20.50 | 25.94 | | | | | |
| Genel Ortalama | | | 17.63 | 24.10 | 15.31 | 22.57 | 17.13 | 23.81 | | | | |

Ortalamalar arasındaki çoklu karşılaştırmalar şekil ve çizelgelerde ayrıca verilmiştir.

1: Transforme olmuş değerler.

Ön işlemin etkisi

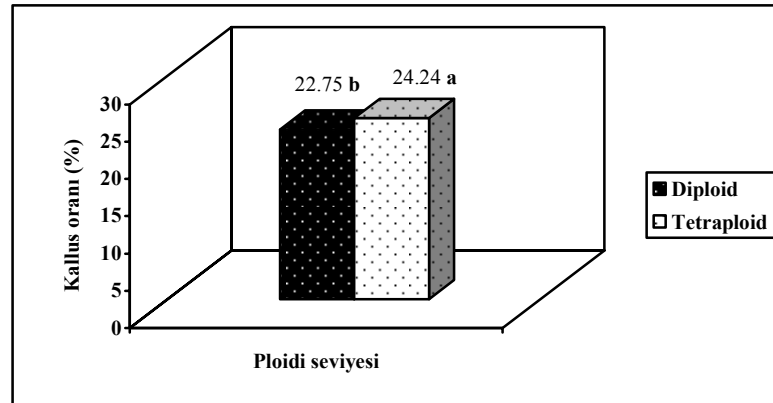
Embriyonik kallus olarak tanımladığımız sert yapıllı kallusların gelişmesi üzerine ön işlemin etkisi önemli ($p < 0.01$) olmuştur (Çizelge 4.2.1). Başakların $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 1 hafta sürede tutulması sert kallus gelişimini önemli derecede arttırmıştır. Nitekim, ön uygulamasız olanlarda kallus oluşum oranı % 22.43 iken, soğuk uygulama yapılanlarda % 24.56 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.2.1).



Şekil 4.2.1. Kallus oranına ön işlemin etkisi

Ploidinin etkisi

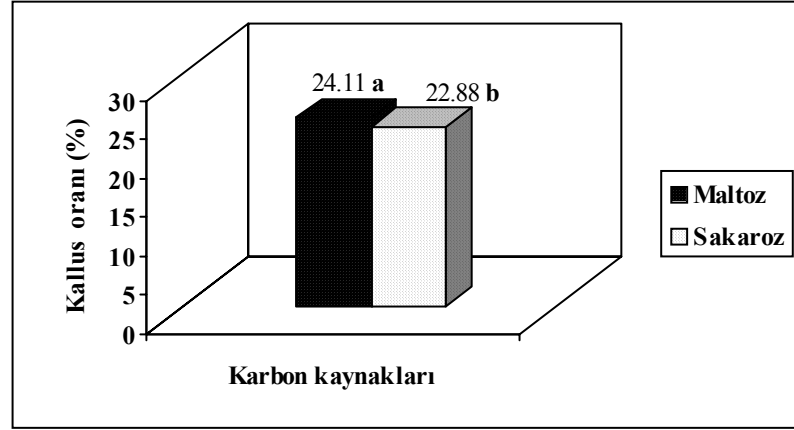
Ploidi seviyesi kallus oranı üzerine önemli ($p < 0.01$) etkide bulunmuş (Çizelge 4.2.1) ve tetraploidlerin kallus oluşumuna reaksiyonu daha fazla olmuştur. Embriyonik kallus oranı diploidlerde % 22.75 iken, tetraploidlerde % 24.24 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.2.2).



Şekil 4.2.2. Kallus oranına ploidinin etkisi

Karbon kaynaklarının etkisi

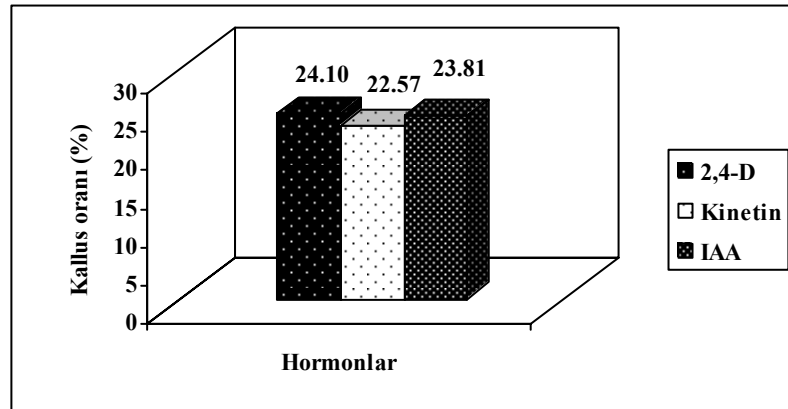
Karbon kaynağı olarak kullandığımız maltoz ve sakarozun kallus oranı üzerine etkisi önemli ($p < 0,05$) bulunmuş (Çizelge 4.2.1) ve maltoz kullanıldığında kallus oranı % 24.11 iken, sakarozda % 22.88 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.2.3).



Şekil 4.2.3. Kallus oranına karbon kaynaklarının etkisi

Hormonların etkisi

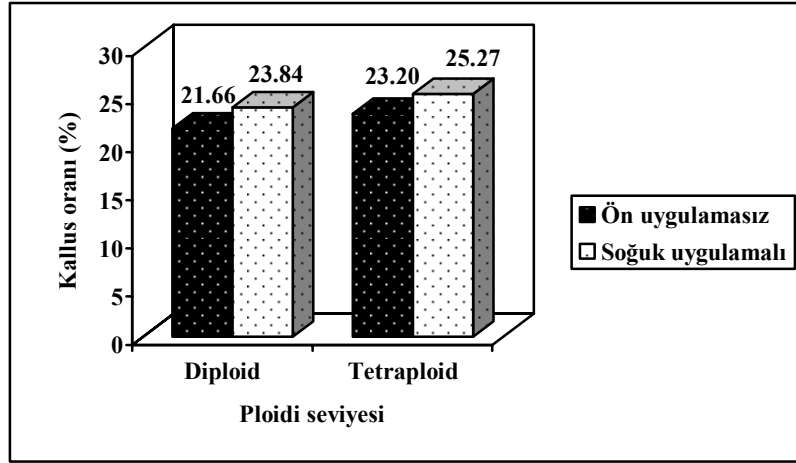
Kallus oranı üzerine, kullanılan 3 farklı hormonun etkisi istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.2.1). Ancak sayısal olarak en düşük kallus oranı % 22.57 ile kinetin kullanılması durumunda elde edilmiş, IAA ve 2,4-D uygulamalarında sonuçlar birbirine yakın olmuştur (Şekil 4.2.4).



Şekil 4.2.4. Kallus oranına hormonların etkisi

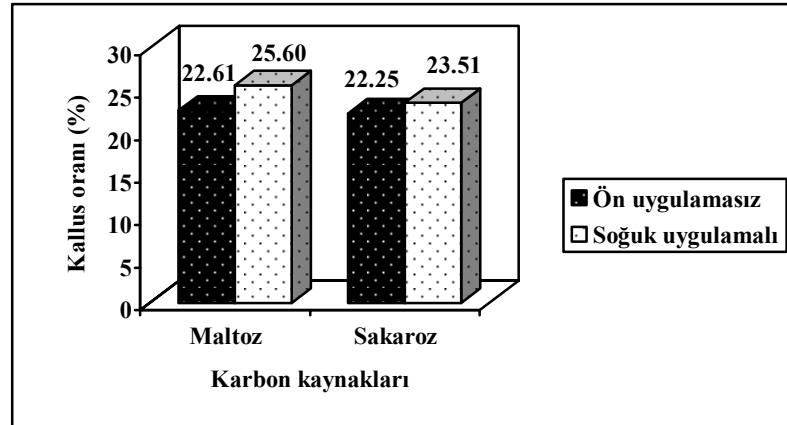
Faktörlerin interaksyonu

Denemede uygulanan faktörlerin ikili interaksyonları incelendiğinde ön işlem x ploidi interaksyonu önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.2.1). Farklı ploidi seviyesine sahip çavdar genotiplerinin ön işlem tepkileri benzer olmuş ve her iki ploidi seviyesinde de soğuk uygulama yapıldığında embriyonik kallus gelişimi daha yüksek bulunmuştur (Şekil 4.2.5).



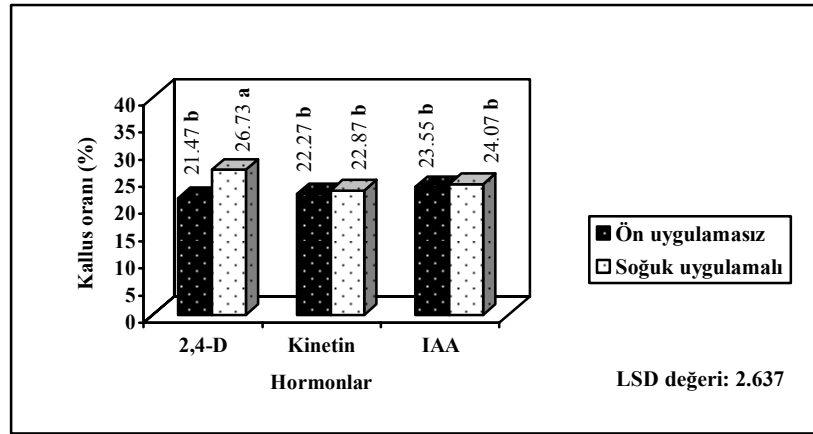
Şekil 4.2.5. Kallus oranına ön işlem x ploidi interaksyonunun etkisi

Ön işlem x karbon kaynakları etkileşiminde kallus oranı % 22.25-25.60 arasında değişmiş ve bu farklılıklar önemsiz bulunmuştur (Şekil 4.2.6).



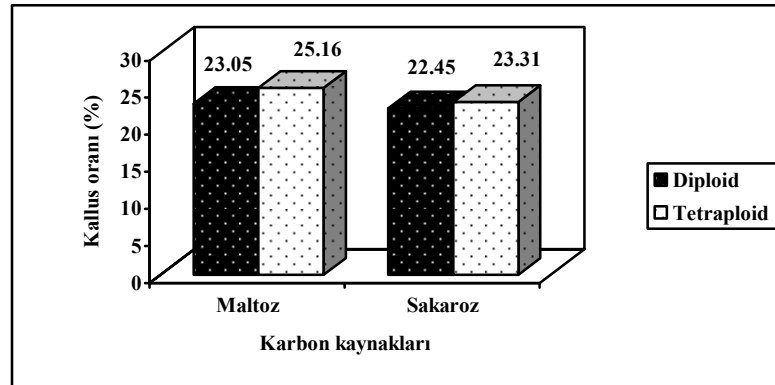
Şekil 4.2.6. Kallus oranına ön işlem x karbon kaynakları interaksyonunun etkisi

Farklı ön işlem uygulamalarında, kullanılan hormonların kallus gelişimi üzerine tepkileri istatistiksel olarak önemli ($p < 0.01$) bulunmuş (Çizelge 4.2.1) ve ön işlem uygulanmadığında en yüksek kallus oranı, IAA kullanımında (% 23.55) belirlenmiş ancak bu değer ile diğer hormon uygulamaları arasındaki fark önemli bulunmamıştır. Soğuk uygulama yapıldığında ise 2,4-D'de en yüksek kallus oranı (% 26.73) elde edilmiştir ve diğerleri ile arasındaki fark önemli olmuştur (Şekil 4.2.7).



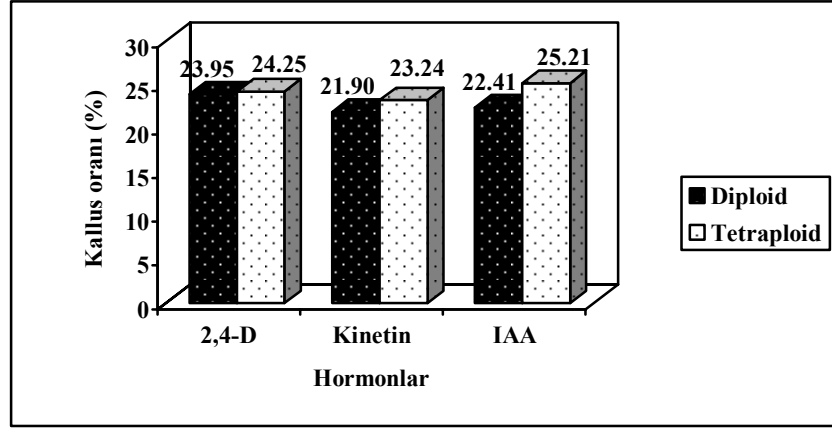
Şekil 4.2.7. Kallus oranına ön işlem x hormon interaksiyonunun etkisi

Farklı ploidi seviyelerinin karbon kaynaklarına karşı tepkisi benzer olmuş ve istatistiksel olarak ploidi x karbon kaynağı interaksiyonu önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.2.1). En düşük kallus oluşum değerleri diploidlerde belirlenmiştir (Şekil 4.2.8).



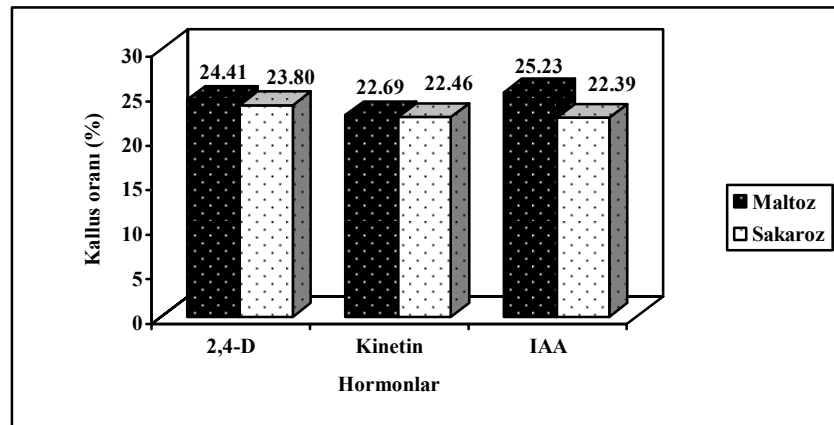
Şekil 4.2.8. Kallus oranına ploidi x karbon kaynakları interaksiyonunun etkisi

Ploidi x hormon interaksyonu da önemli bulunmamış (Çizelge 4.2.1), her iki ploidi seviyesinde de en düşük kallus oranları kinetin uygulamasından elde edilmiştir (Şekil 4.2.9).



Şekil 4.2.9. Kallus oranına ploidi x hormon interaksyonunun etkisi

Karbon kaynakları ve hormon etkileşimi dikkate alındığında kallus oranı % 22.39-25.23 arasında değişmiş ve bu farklılık önemli bulunmamıştır (Çizelge 4.2.1). Karbon kaynaklarına hormonların tepkisi benzer olmuştur. Maltoz şekeri kullanıldığında üç hormon uygulamasında, diğer karbon kaynağına göre yüksek değerler elde edilmiştir (Şekil 4.2.10).



Şekil 4.2.10. Kallus oranına karbon kaynakları x hormon interaksyonunun etkisi

Kallus gelişimi üzerine faktörlerin üçlü kombinasyonları incelendiğinde ön işlem x ploidi x karbon kaynakları; ön işlem x ploidi x hormon; ön işlem x karbon kaynakları x hormon interaksyonları istatistiksel olarak önemsiz bulunmuş (Çizelge 4.2.1) ve tüm bu faktörlerin kallus oranına ait değerleri Çizelge 4.2.2’de gösterilmiştir.

Kallus gelişimi üzerine tüm faktörlerin birlikte interaksyonu (ön işlem x ploidi x karbon kaynakları x hormon) istatistiksel olarak önemli olmuştur (Çizelge 4.2.1). Kallus oluşumu üzerine çoklu interaksyon değerleri incelendiğinde ön işlem yapılmayanlarda diğer faktörlerin etkisi birbirine benzer olmuş ve hepsi aynı grup içerisinde yer almış, soğuk uygulaması diğer faktörlerin etkisini azaltmış yada arttırmıştır (Çizelge 4.2.3).

Çizelge 4.2.3. Kallus oranına ön işlem x ploidi x karbon kaynakları x hormon interaksyonunun etkisi

| Ön İşlem | Ploidi Seviyesi | Karbon Kaynakları | Hormon | Kallus Oranı (%) | |
|--------------------------|-----------------|-------------------|---------|------------------|----------------------|
| Ön uygulamasız | Diploid | Maltoz | 2,4-D | 13.00 | 20.87 ¹ c |
| | | | Kinetin | 13.50 | 21.28 c |
| | | | IAA | 16.50 | 23.57 bc |
| | | Sakaroz | 2,4-D | 14.00 | 21.69 c |
| | | | Kinetin | 13.00 | 20.87 c |
| | | | IAA | 14.00 | 21.69 c |
| | Tetraploid | Maltoz | 2,4-D | 14.50 | 22.02 c |
| | | | Kinetin | 17.50 | 24.03 bc |
| | | | IAA | 17.00 | 23.90 bc |
| | | Sakaroz | 2,4-D | 13.50 | 21.28 c |
| | | | Kinetin | 15.50 | 22.91 bc |
| | | | IAA | 18.50 | 25.05 bc |
| Soğuk uygulmalı | Diploid | Maltoz | 2,4-D | 22.00 | 26.40 a-c |
| | | | Kinetin | 17.00 | 23.77 bc |
| | | | IAA | 15.50 | 22.43 bc |
| | | Sakaroz | 2,4-D | 21.50 | 26.83 a-c |
| | | | Kinetin | 14.00 | 21.69 c |
| | | | IAA | 14.50 | 21.95 c |
| | Tetraploid | Maltoz | 2,4-D | 23.50 | 28.32 ab |
| | | | Kinetin | 14.00 | 21.69 c |
| | | | IAA | 28.00 | 31.01 a |
| | | Sakaroz | 2,4-D | 19.00 | 25.38 a-c |
| | | | Kinetin | 18.00 | 24.36 bc |
| | | | IAA | 13.00 | 20.87 c |
| LSD değeri: 5.274 | | | | | |

1: Transforme olmuş değerler.

4.3. Kallus Büyüklüğü

Diploid ve tetraploid çavdara ait anterlerin başlangıç besin ortamında kültüre alınmalarından yaklaşık olarak 3-3.5 ay sonra kallus büyüklüğü değerlendirilmiştir. Kallusların büyüklüğü kumpas yardımı ile mm'lik olarak ölçülmüş daha sonra rejenerasyon ortamına aktarılmıştır Kallus büyüklüğü değerlerinin varyans analiz sonuçları Çizelge 4.3.1 ve incelenen faktörlerin kallus büyüklüğüne etkisi Çizelge 4.3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3.1. Çavdarda (*S. cereale*) kallus büyüklüğüne ait varyans analiz sonuçları

| Varyasyon Kaynakları | Serbestlik Derecesi | Kallus Büyüklüğü F Değerleri |
|----------------------|---------------------|------------------------------|
| Ön İşlem (1) | 1 | 39.3013** |
| Ploidi (2) | 1 | 13.7063** |
| Karbon (3) | 1 | 45.2460** |
| Hormon (4) | 2 | 13.2559** |
| 1x2 | 1 | 256.9726** |
| 1x3 | 1 | 39.0178** |
| 1x4 | 2 | 0.1971 |
| 2x3 | 1 | 1.6697 |
| 2x4 | 2 | 10.5843** |
| 3x4 | 2 | 19.2661** |
| 1x2x3 | 1 | 41.4381** |
| 1x2x4 | 2 | 0.6700 |
| 1x3x4 | 2 | 25.3946** |
| 2x3x4 | 2 | 0.2971 |
| 1x2x3x4 | 2 | 27.3184** |
| Hata | 456 | |
| Genel | 479 | |

** : %1 seviyesinde önemlidir.

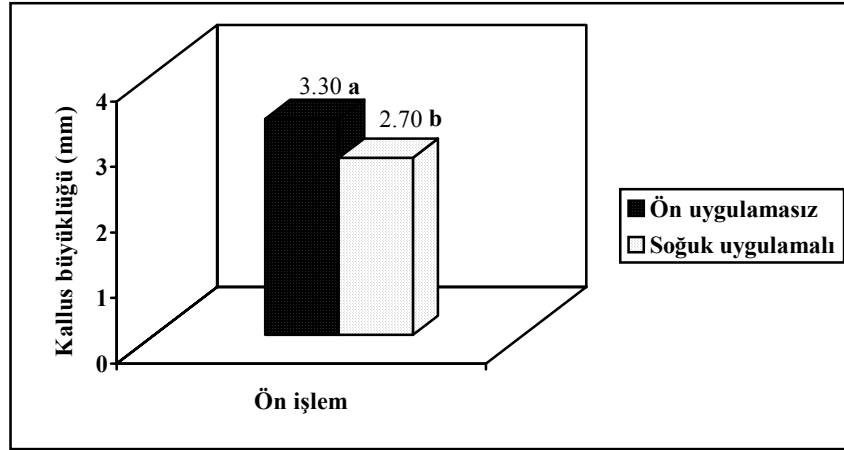
Ön işlemin etkisi

Kallus büyüklüğü üzerine ön işlemin etkisi önemli ($p < 0.01$) bulunmuştur (Çizelge 4.3.1). Ön işlem uygulanmış (soğuk uygulama yapılmış) anterlerden elde edilen kallus büyüklüğünün, uygulanmayanlara göre daha küçük olduğu tespit edilmiştir. Nitekim, araştırmada ortalama kallus büyüklüğü soğuk uygulama yapılanlarda 2.70 mm diğerlerinde ise 3.30 mm olarak ölçülmüştür (Çizelge 4.3.2; Şekil 4.3.1).

Çizelge 4.3.2. Çavdarda (*S. cereale*) ön işlem, ploidi, karbon kaynakları ve hormon uygulamalarında kallus büyüklükleri (mm)

| Ön İşlem | Ploidi Seviyesi | Karbon Kaynağı | Hormon | | | Ortalama | Genel Ortalama |
|-----------------------|-----------------|----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------------|
| | | | 2,4-D | Kinetin | IAA | | |
| Ön Uygulamasız | Diploid | Maltoz | 2.15 | 2.54 | 3.12 | 2.60 | |
| | | Sakaroz | 2.65 | 2.10 | 1.55 | 2.10 | |
| | Ortalama | | 2.40 | 2.32 | 2.33 | | |
| | Tetraploid | Maltoz | 3.69 | 6.03 | 5.96 | 5.23 | |
| | | Sakaroz | 3.88 | 2.05 | 3.81 | 3.25 | |
| Ortalama | | 3.79 | 4.04 | 4.89 | | 3.30 | |
| Soğuk Uygulamalı | Diploid | Maltoz | 3.21 | 3.51 | 3.94 | 3.55 | |
| | | Sakaroz | 3.35 | 2.78 | 2.92 | 3.02 | |
| | Ortalama | | 3.28 | 3.15 | 3.43 | | |
| | Tetraploid | Maltoz | 1.69 | 1.03 | 2.93 | 1.88 | |
| | | Sakaroz | 1.40 | 3.17 | 2.42 | 2.33 | |
| Ortalama | | 1.54 | 2.10 | 2.68 | | 2.70 | |
| Genel Ortalama | | | 2.75 | 2.90 | 3.33 | | |

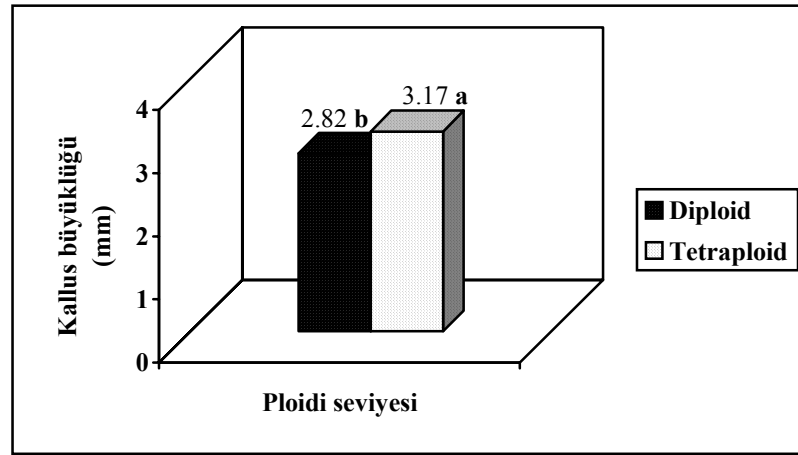
Ortalamalar arasındaki çoklu karşılaştırmalar şekil ve çizelgelerde ayrıca verilmiştir.



Şekil 4.3.1. Kallus büyüklüğüne ön işlemin etkisi

Ploidinin etkisi

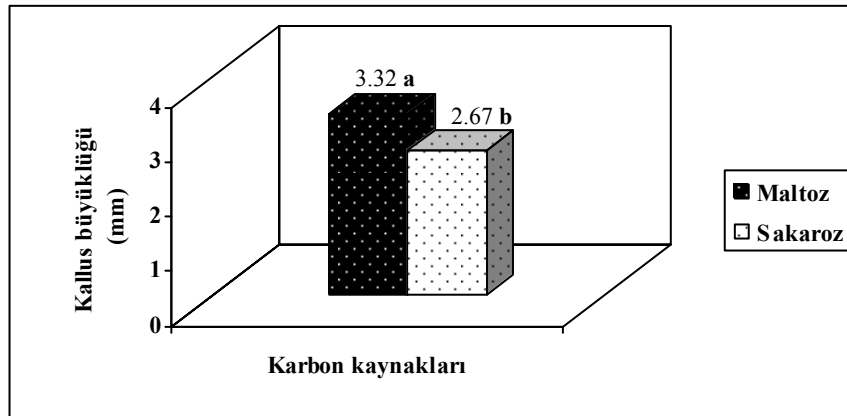
Ploidi seviyesinin kallus büyüklüğü üzerine etkisi istatistiki olarak önemli ($p < 0.01$) bulunmuştur (Çizelge 4.3.1). Tetraploidlerde kallus büyüklüğü (3.17 mm) diploidlerden (2.82 mm) daha büyük olarak belirlenmiştir (Şekil.4.3.2).



Şekil 4.3.2. Kallus büyüklüğüne ploidin etkisi

Karbon kaynaklarının etkisi

Karbon kaynağı olarak kullanılan maltoz ve sakarozun kallus büyüklüğü üzerine etkisi önemli ($p < 0.01$) bulunmuştur (Çizelge 4.3.1). Maltozun kullanıldığı uygulamalarda ortalama kallus büyüklüğünün 3.32 mm, sakarozda ise 2.67 mm olduğu ortaya konulmuştur (Şekil 4.3.3).

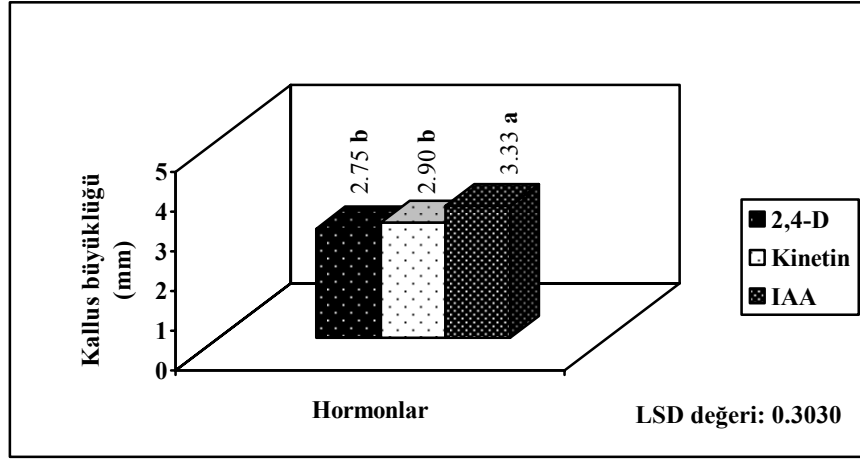


Şekil 4.3.3. Kallus büyüklüğüne karbon kaynaklarının etkisi

Hormonların etkisi

Araştırmada kullanılan 3 farklı hormonun kallus büyüklüğü üzerinde etkisi istatistiksel olarak önemli ($p < 0.01$) bulunmuştur (Çizelge 4.3.1). Kallus büyüklüğü en yüksek IAA kullanılan uygulamada ölçülmüş (3.33 mm) ve diğer uygulamalardan

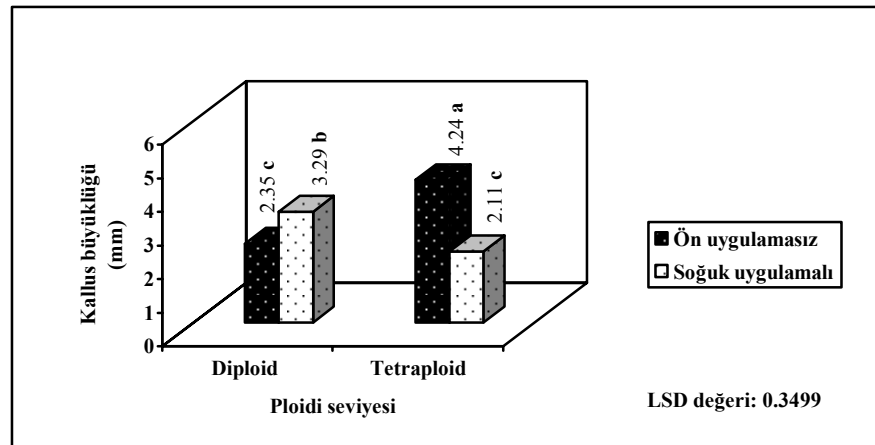
(2,4-D ve kinetin) elde edilen sonuçlar sırasıyla 2.75 ve 2.90 mm olarak birbirine yakın bulunmuştur (Şekil 4.3.4).



Şekil 4.3.4. Kallus büyüklüğüne hormonların etkisi

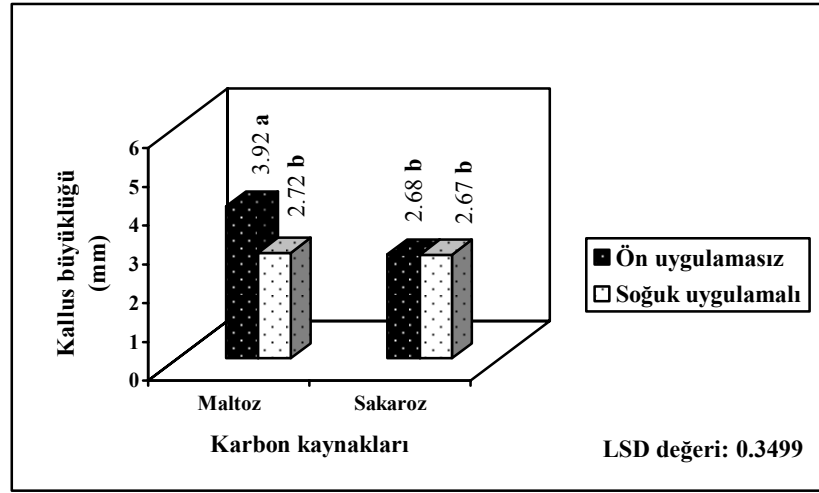
Faktörlerin interaksyonu

Denemede uygulanan faktörlerin ikili interaksyonları incelendiğinde ön işlem x ploidi interaksyonu istatistiki olarak önemli ($p < 0.01$) bulunmuştur (Çizelge 4.3.1). Farklı ploidi seviyesine sahip anterler, ön işlem uygulamasında farklı reaksiyon göstermiş ve ön işlem uygulanmayanlarda tetraploidlerin kallus büyüklüğü 4.24 mm iken, soğuk uygulamasında 2.11 mm'ye düşmüştür (Şekil 4.3.5).



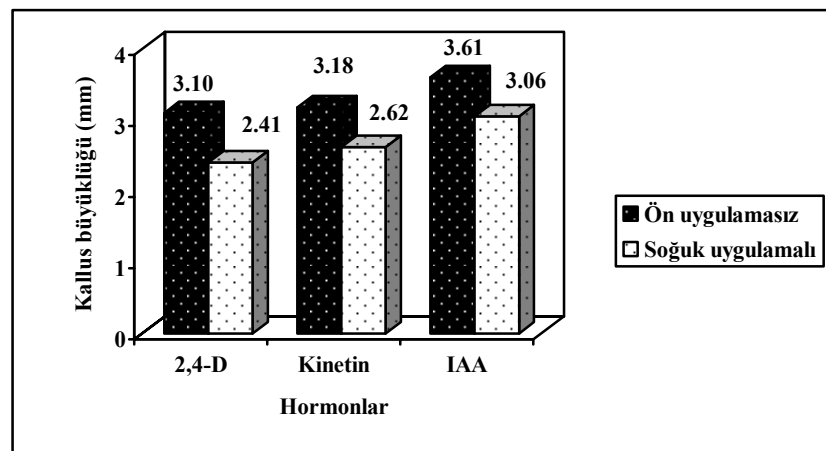
Şekil 4.3.5. Kallus büyüklüğüne ön işlem x ploidi interaksyonunun etkisi

Kallus büyüklüğü ön işlem x karbon kaynakları interaksiyonuna göre incelendiğinde, sakaroz kullanımının etkisi her iki uygulamada benzer olmuş, ancak ön işlem yapılmamış çalışmalarda maltoz kullanımında en yüksek kallus büyüklüğü (3.2 mm) elde edilmiştir (Şekil 4.3.6). İkili interaksiyonun kallus büyüklüğü üzerine etkisi istatistiki olarak önemli ($p < 0.01$) bulunmuştur (Çizelge 4.3.1)



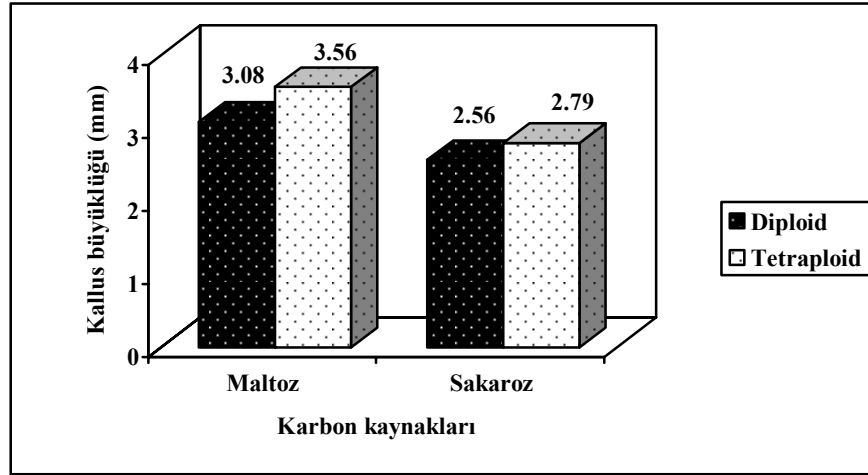
Şekil 4.3.6. Kallus büyüklüğüne ön işlem x karbon kaynakları interaksiyonunun etkisi

Ön işlem ve hormon etkileşimi dikkate alındığında kallus büyüklüğü 2.41–3.61 mm arasında değişmiş (Şekil 4.3.7.) ve ikili etkileşim istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.3.1).



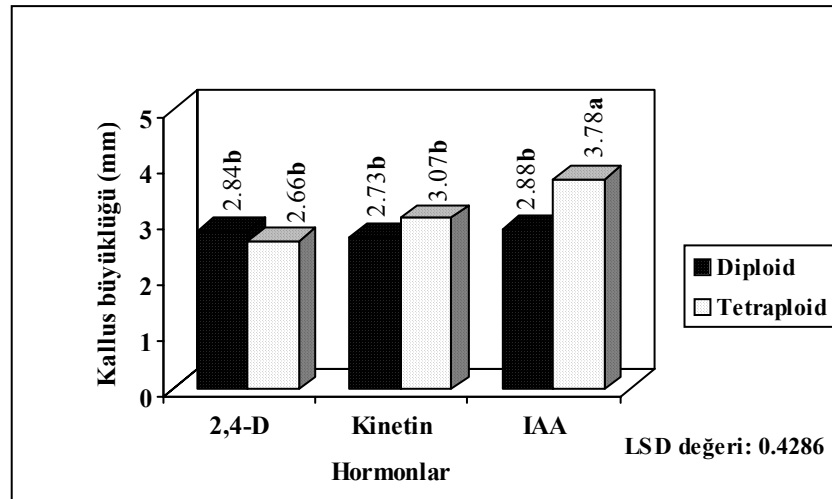
Şekil 4.3.7. Kallus büyüklüğüne ön işlem x hormon interaksiyonunun etkisi

Ploidi seviyesine göre karbon uygulamalarının kallus büyüklüğüne etkisi istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.3.1). En yüksek değerler tetraploidlerde (3.56 mm) ve diploidlerde (3.08 mm) maltoz kullanımında elde edilmiştir (Şekil 4.3.8).



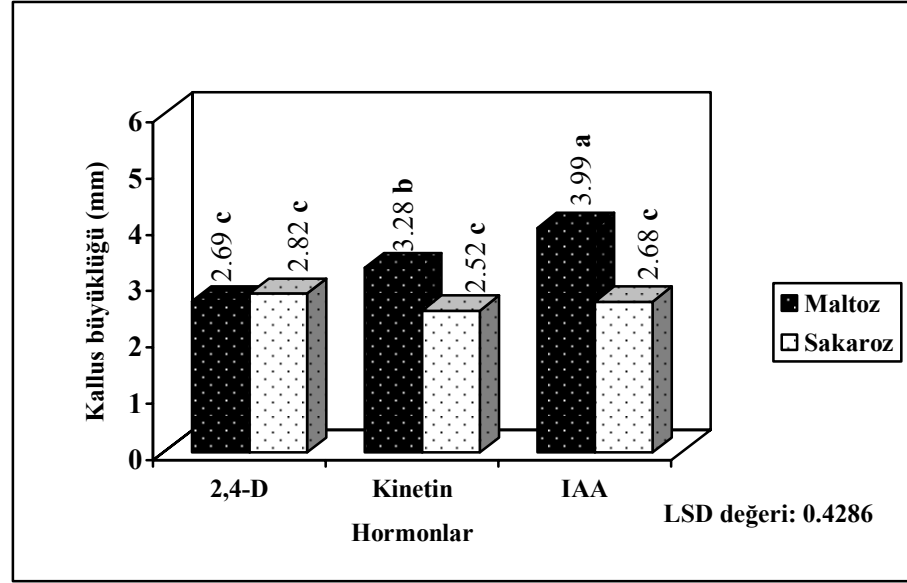
Şekil 4.3.8. Kallus büyüklüğüne ploidi x karbon kaynakları etkisinin etkisi

Ploidi x hormon etkisinin kallus büyüklüğü üzerine etkisi önemlidir ($p < 0.01$; Çizelge 4.3.1). Bununla birlikte en büyük kalluslar tetraploidlerde IAA uygulamasında (3.78 mm) belirlenmiştir. Diploidlerde elde edilen değerler birbirine yakın olmuş ve istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (Şekil 4.3.9).



Şekil 4.3.9. Kallus büyüklüğüne ploidi x hormon etkisinin etkisi

Farklı karbon kaynaklarında kullanılan hormonların kallus büyüklüğü üzerine etkileri istatistiksel olarak önemli ($p<0.01$) bulunmuştur (Çizelge 4.3.1). Maltoz kullanıldığında IAA tepkisi daha fazla olmuş ve uygulanan hormonlara göre kallus büyüklüğü 2.52-3.99 mm arasında değişmiştir. Karbon kaynağı olarak sakaroz kullanıldığında hormonların önemli bir etkisi olmamıştır (Şekil 4.3.10).



Şekil 4.3.10. Kallus büyüklüğüne karbon kaynakları x hormon interaksiyonunun etkisi

Kallus büyüklüğü üzerine faktörlerin üçlü kombinasyonları incelendiğinde ön işlem x ploidi x karbon kaynakları etkileşimleri önemli ($p<0.01$) çıkmış (Çizelge 4.3.1) ve kallus büyüklükleri 1.88-5.23 mm arasında değişmiştir. Tetraploidlerde ön işlemsiz uygulamada maltoz kullanımı en büyük kallusları (5.23 mm) meydana getirmesine rağmen, soğuk uygulama yapıldığında ortalama kallus büyüklüğü 1.88 mm olmuştur (Çizelge 4.3.3).

Ön işlem x karbon x hormon interaksiyonu kallus büyüklüğünü önemli ($p<0.01$) seviyede etkilemiştir (Çizelge 4.3.1). En büyük kallus oluşumu (4.54 mm) ön işlem yapılmamış, maltoz ve IAA uygulamasından elde edilmiş, en düşük (2.08 mm) ise ön işlemsiz uygulamada, sakaroz ve kinetin uygulamasından elde edilmiştir (Çizelge 4.3.4).

Çizelge 4.3.3. Kallus büyüklüğüne ön işlem x ploidi x karbon kaynakları interaksiyonunun etkisi

| Ön İşlem | Ploidi Seviyesi | Karbon Kaynakları | Kallus Büyüklüğü (mm) |
|--------------------|-----------------|-------------------|-----------------------|
| Ön uygulamasız | Diploid | Maltoz | 2.60 de |
| | | Sakaroz | 2.10 ef |
| | Tetraploid | Maltoz | 5.23 a |
| | | Sakaroz | 3.25 bc |
| Soğuk uygulamalı | Diploid | Maltoz | 3.55 b |
| | | Sakaroz | 3.02 cd |
| | Tetraploid | Maltoz | 1.88 f |
| | | Sakaroz | 2.33 ef |
| LSD değeri: 0.4949 | | | |

Çizelge 4.3.4. Kallus büyüklüğüne ön işlem x karbon kaynakları x hormon interaksiyonunun etkisi

| Ön İşlem | Karbon Kaynakları | Hormon | Kallus Büyüklüğü (mm) |
|--------------------|-------------------|---------|-----------------------|
| Ön uygulamasız | Maltoz | 2,4-D | 2.92 b-e |
| | | Kinetin | 4.28 a |
| | | IAA | 4.54 a |
| | Sakaroz | 2,4-D | 3.27 bc |
| | | Kinetin | 2.08 f |
| | | IAA | 2.68 c-f |
| Soğuk uygulamalı | Maltoz | 2,4-D | 2.45 d-f |
| | | Kinetin | 2.27 ef |
| | | IAA | 3.44 b |
| | Sakaroz | 2,4-D | 2.37d-f |
| | | Kinetin | 2.97 b-d |
| | | IAA | 2.67 c-f |
| LSD değeri: 0.6061 | | | |

Üçlü interaksiyonlardan ön işlem x ploidi x hormon interaksiyonlarının istatistiki olarak önemsiz olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.3.1). Kallus büyüklüğü 1.54-4.89 mm arasında değişmiştir (Çizelge 4.3.2). Yine, ploidi x karbon kaynakları x hormon interaksiyonları önemsiz olmakla birlikte (Çizelge 4.3.1) kallus büyüklüğü 2.24-4.45 mm arasında değişmiştir (Çizelge 4.3.2).

Tüm faktörlerin birbirleriyle olan etkileşimi istatistiksel olarak önemli ($p < 0.01$) bulunmuştur (Çizelge 4.3.1) ve kallus büyüklüğü 1.03-6.03 arasında değişmiştir (Çizelge 4.3.5).

Çizelge 4.3.5. Kallus büyüklüğüne ön işlem x ploidi x karbon kaynakları x hormon interaksiyonunun etkisi

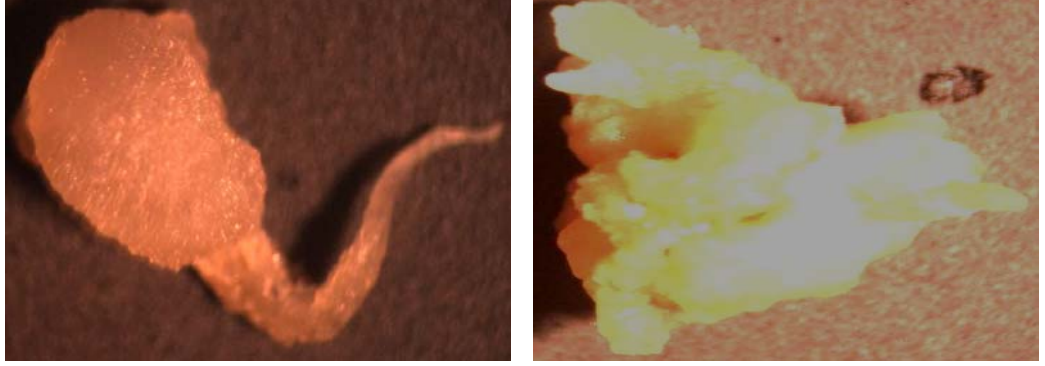
| Ön İşlem | Ploidi Seviyesi | Karbon Kaynakları | Hormon | Kallus Büyüklüğü (mm) |
|--------------------|-----------------|-------------------|---------|-----------------------|
| Ön uygulamasız | Diploid | Maltoz | 2,4-D | 2.15 g-k |
| | | | Kinetin | 2.54 e-ı |
| | | | IAA | 3.12 b-g |
| | | Sakaroz | 2,4-D | 2.65 e-ı |
| | | | Kinetin | 2.10 h-k |
| | | | IAA | 1.55 j-l |
| | Tetraploid | Maltoz | 2,4-D | 3.69 b-d |
| | | | Kinetin | 6.03 a |
| | | | IAA | 5.96 a |
| | | Sakaroz | 2,4-D | 3.88 bc |
| | | | Kinetin | 2.05 h-k |
| | | | IAA | 3.81 bc |
| Soğuk uygulamalı | Diploid | Maltoz | 2,4-D | 3.21 b-f |
| | | | Kinetin | 3.51 b-e |
| | | | IAA | 3.94 b |
| | | Sakaroz | 2,4-D | 3.35 b-f |
| | | | Kinetin | 2.78 d-h |
| | | | IAA | 2.92 c-h |
| | Tetraploid | Maltoz | 2,4-D | 1.69 ı-l |
| | | | Kinetin | 1.03 l |
| | | | IAA | 2.93 c-h |
| | | Sakaroz | 2,4-D | 1.40 kl |
| | | | Kinetin | 3.17 b-f |
| | | | IAA | 2.42 f-j |
| LSD değeri: 0.8571 | | | | |

4.4. Gelişme Ortamında Kök ve Bitkicik Oluşumu

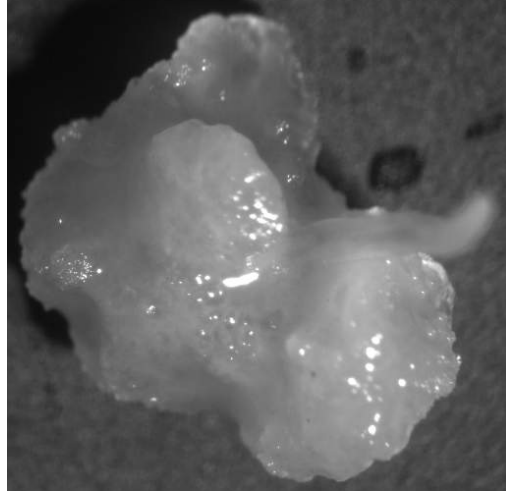
Kallus büyüklüğünün değerlendirildiği anterlerin sert yapılı ve sarımsı yeşil renkte olan kallusları (Şekil 4.4.1) gelişme ortamına aktarılmıştır. Gelişme ortamının içeriği Çizelge 3.2.2.1’de verilmiştir. Yumuşak ve sulu yapıda (Şekil 4.4.2) genel kallus rengini taşımayanlar gelişme ortamına aktarılmamıştır.

Genel olarak soğuk uygulama yapılanlarda daha fazla kök oluşumu gözlenmiştir. Diploid çavdar bitkilerine ait ön uygulamasız anterlerden karbon kaynağı olarak

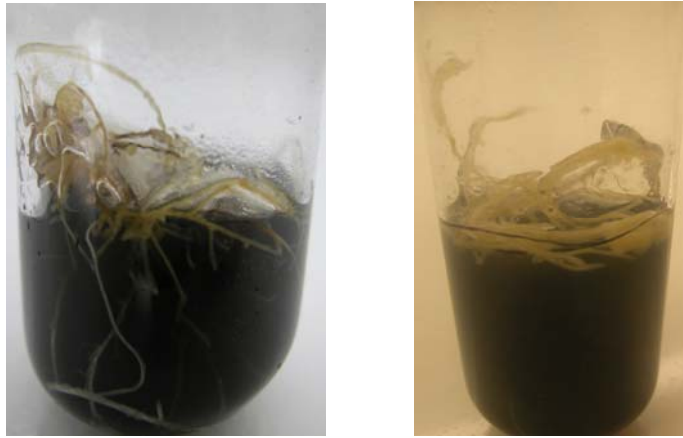
maltoz ve IAA içeren ortamlardan aktarılan kalluslarda yaklaşık 2-3 ay sonra köklenme meydana gelmiştir (Şekil 4.4.3).



Şekil 4.4.1. Sert yapılı kallusların genel görünümü



Şekil 4.4.2. Yumuşak yapılı kallusun genel görünümü



Şekil 4.4.3. Diploid çavdar anterlerinden oluşan kallusların kök gelişimi

Ön işlem uygulanmış olanlarda ise sakarozun kullanıldığı ve 2,4-D ihtiva eden ortamlardan aktarılan kalluslarda köklenme olmuş ve bu süre 3 aydan daha uzun sürmüştür.

Tetraploidlerde çok az sayıda kökün oluştuğu ve bu köklerinde çok zayıf olduğu gözlenmiştir ve bunlar aşırı tüylü ve üzerinde embriyo benzeri strüktürler meydana getirmiştir (Şekil 4.4.4).



Şekil 4.4.4. Gelişme ortamına aktarılan tetraploid çavdar kalluslarında kök oluşumu

Diploid bitkilerde kalluslardan oluşan köklerden alınan kök ucu örneklerinde kromozom sayısının $2n=7$ ve 14 olduğu ortaya konulmuştur. Tetraploidlerde normal bir kök oluşumu sağlanamadığından sayım yapılamamıştır. Diploidlerde başlangıç ortamında ön uygulama yapılan ve karbon kaynağının maltoz olduğu, 2,4-D içeren ortamdan aktarılan kalluslarda çok az sayıda bitkicik oluşturulabilmiş, bunlar steril perlit ve torf karışımına aktarılmıştır (Şekil 4.4.5). Ancak bu bitkicikler belirli bir süre alıştırma ortamına konulduktan 10 gün sonra ölmüştür. Oluşan bitkicikler uzun süre yaşatılamadığından kromozom sayımları gerçekleştirilememiştir.



Şekil 4.4.5. Diploid çavdar anterlerinden bitkicik rejenerasyonu

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu araştırmada kültür avdarının anterlerinden haploid bitkinin elde edilebilmesi için uygun invitro ortamının belirlenmesine çalışılmıştır. Bu amaca yönelik olarak değişik faktörlerin (n işlem, ploidi, karbon kaynakları ve hormonlar) kallus ve somatik embriyoların oluşumu üzerine etkileri belirlenmiştir. Araştırmada modifiye edilmiş N₆ ortamı ile kültür avdarlarının diploid (2n=14) ve tetraploid (2n=28) populasyonları kullanılmıştır. n işlem uygulamasında +4 °C’de 1 hafta süre ile karanlıkta başaklar saplı olarak su içinde tutulmuştur. Modifiye edilmiş N₆ ortamına karbon kaynağı olarak maltoz ve sakkaroz, hormon kaynakları olarak da 2,4-D, kinetin ve IAA ilave edilmiştir. Başlangıç ortamı olarak bu faktörlerin anter reaksiyonu, kallus oluşumu ve büyüklüğü üzerine etkileri belirlenmiştir. avdarda anter kültürü çalışmalarında en büyük sorun rejenerasyon kapasitesinin çok düşük olmasıdır (Flehinghaus ve ark., 1991). Bu nedenle bu sorunu gidermeye yönelik olarak değişik araştırmacılar tarafından bir çok araştırma yapılmıştır (Milewska-Pawliczuk, 1987; Flehinghaus ve ark., 1991; Daniel, 1993; Rakoczy-Trejanowska ve ark., 1997; Immonen ve Anttila, 1998; Immonen, 1999; Ma ve ark., 2004).

Tarla şartlarında yetiştirilen bitkilerin anterleri kültür ortamına alınmadan önce, mikrosporların gelişme dönemi olarak yaklaşık tek çekirdekli oldukları dönem mikroskopta belirlenmiş ve başakların morfolojik tanımlaması yapılmıştır. Başaklar bayrak yapraktan kılıklarının görülmeye başladığı karınlanma döneminde olduğunda, anterlerin bu döneme ait polenleri genel olarak bulundurduğu tespit edilmiştir. Değişik araştırmacılar anter kültüründe başarıyı etkileyen faktörlerden birisinin, polen gelişme dönemi olduğunu bildirmişler ve ilk polen mitozu civarındaki bir evrenin çavdarda androgenetik oluşum için optimal dönem olduğunu ileri sürmüşlerdir (Wenzel ve Thomas, 1974; Thomas ve ark., 1975; Flehinghaus-Roux ve ark., 1995). Yine farklı bitkiler üzerinde yapılan çalışmalarda mikrosporun tek çekirdekli döneminin uygun olduğu bildirilmiştir (Yin ve ark., 1976; Huang ve Sunderland, 1982; He ve Quyang, 1984; Powell, 1988; Shahjahan ve ark., 1992; Gürel ve ark., 1993; Immonen ve Anttila, 1998).

Araştırmamızda faktör olarak kullanılan soğuk ön işlem uygulaması, incelenen özelliklere önemli etkide bulunmuş, başlangıçta anter responsunu azaltmış olsa da daha sonraki dönemde kallus oluşturan anter oranını arttırmıştır. Ancak oluşan kallusların büyüklüğünü azaltıcı bir etki yapmıştır. Bu durumun kallus oluşturan anter sayısının daha fazla olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Nitekim kavanoz içerisinde fazla sayıda kallus oluşturan anterin bulunması kallus büyüklüğünü olumsuz etkilemiş olabilir. Kültür ortamındaki CO₂ oranı, fotoperiyodik düzen ve anterlerin yerleştirme yoğunluğu kallus oluşumu üzerine etkilidir (Jing ve Hu, 1987; Li ve ark., 1991; Ma ve ark., 2004). Soğuk ön işlem uygulamasının, kallusların gelişme ortamına aktarılması ile kök oluşumu ve somatik embriyonik yapıların oluşmasında olumlu etkisi gözlenmiştir. Nitekim çavdarda başakların doğrudan soğuk ön işleme tutulması, kallus oluşumunu ve yeşil bitki rejenerasyonunu arttırdığı değişik araştırmacılar tarafından belirlenmiştir (Flehinghaus ve ark., 1991; Guo ve Pulli, 2000; Ma ve ark., 2004). Ön işlem uygulamasının denemede ele alınan faktörlerle önemli interaksiyon gösterdiği belirlenmiştir. Nitekim androgenesis için soğuk ön işlem uygulamasının genotip, donör bitkilerin yetiştirme koşulları, kültür şartları gibi faktörlerle interaksiyon durumunda olabileceği Ma ve ark. (2004) tarafından ileri sürülmüştür.

Soğuk ön işlem uygulaması bir çok araştırmacılar tarafından kullanılmıştır. Thomas ve ark. (1975) 6 °C'de 3-5 gün, Lorenz (1989) 4-5 °C'de 8-14 gün, Flehinghaus ve ark. (1991) 4 °C'de 1 hafta, Daniel (1993) +4 °C'de 7 gün, Ma ve ark. (2004) 4 °C'de 3-4 hafta soğuk uygulamasının yeşil bitki rejenerasyonunu arttırdığını belirlemişlerdir. Araştırmacılar uygun sürenin genotipe ve kültür şartlarına göre değiştiğini ortaya koymuşlardır.

Soğuk uygulamasının, bitkilerde androgenesisini teşvik etmesinin nedenleri arasında mikrosporların daha uzun süre canlı kalması (Bajaj, 1983); polen embriyogenesisini tetiklediği (Heberle-Bors ve ark., 1996); zayıf ve güçlü olmayan anter ve mikrosporların bu şekilde öldürülmesi ile başağın kuvvetli ve canlı mikrosporlarla zenginleştirilmesi (Vasil, 1980); aminoasitlerin ve proteinlerin serbest kalarak polen

duvarı yaşlılığını geciktirdiği (Fang ve Liang, 1985; Xie ve ark., 1997; Kiviharju ve Pehu, 1998) gösterilmiştir.

İnvitro şartlarında androgenesis ve somatik embryogenesis, çekirdek ve stoplazmada bulunan genetik faktörler etkili olabilmektedir (Henry ve ark., 1994). Nitekim bu çalışmada kallus büyüklüğü ve kallus oluşturan anter oranı üzerine farklı ploidi seviyesine sahip genotiplerin etkisi önemli olmuştur. Ancak anter tepki oranına ploidi seviyesinin etkisi önemsiz bulunmuştur. Gelişme ortamındaki tetraploidlere ait kallusların aşırı tüylü ve çok az kök oluşturduğu gözlenmiştir. Bu tüylülük yapısına aktif karbonun sebep olacağı düşünülmektedir. Nitekim biber bitkisinde anter kültürü çalışmalarında aktif kömür içeren ortamlar kullanılmış ancak bu ortamlarda embriyoya dönüşümün tamamlanamadığı ve sadece tüylü kök oluşumunun görüldüğü ortaya konulmuştur (Ellialtıoğlu ve Tıprıdamaz, 1997). Diploidlerde kültür ortamında anter responsu daha yüksek bulunmuş ve gelişme ortamına aktarılan kallusların büyük bir çoğunluğunda kök oluşumu sağlanmıştır. Rakoczy-Trojanowska ve ark. (1997) tarafından yapılan çalışmada, tüm genotipler için tek bir ortam belirlenememiş ve genotiplere göre kallus oluşumu % 0.00-11.94 arasında değişmiştir. Flehinghaus ve ark. (1991) tarafından yapılan bir çalışmada, çavdarın Double Haploid (DH) hattı ve tetraploid TEKÜ çeşidi kullanılmıştır. Double Haploidlerin anter kültürü için tetraploid çeşitten daha uygun olduğu belirlenmiştir. Bu farklılığın genetik kompozisyonundan kaynaklandığı ve Double Haploid hattın homozigot ve androjenetik orjinli olmasından dolayı uygun genetik faktörler içerebileceği ileri sürülmüştür. Araştırmacılar TEKÜ tetraploid varyetesinin genetik yapı olarak heterozigot bir populasyon olmasının ve bunların mikrosporlarının genetik olarak geniş farklılık içermesinin, rejenerasyon oranı ve kallus oranını azalttığını ortaya koymuşlardır. Diploid ve tetraploid çavdarın kullanıldığı bizim çalışmamızda, transforme yapılmamış değerlere göre kültür ortamına alınan anterlerin tepki oranı, diploidlerde (% 74.54) tetraploidlere göre daha yüksek bulunmuştur. Diğer taraftan kallus oluşturan anter oranı (% 17.67) ve kallus büyüklüğü (3.17 mm) tetraploidlerde daha fazla olmuştur. Denemede uygulanan diğer faktörlerin etkisiyle kallus oluşumu % 28.00'e kadar yükseltilmiştir. Diploidlerde ise bu oran % 22.00'e kadar artmıştır. Ancak tetraploidlerde oluşan

kalluslarda normal kök oluşumu ve bitki rejenerasyonu sağlanamamıştır. Bu durumun tetraploidlerde her allel için diploidlerden (AA, Aa, aa) daha fazla heterozigotluğun bulunması yanında ortam faktörleri de etkili olmuş olabilir. Bu nedenle tetraploidler için farklı ortam denenmesi uygun olacaktır. Nitekim androgenetik haploidlerin teşvikinde bitki genotipinin önemli olduğu değişik bitkiler üzerinde çalışan araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Johri ve Rao, 1984; Petolino ve Jones, 1986; El Haddoury ve ark., 1993; Hatipoğlu ve Sakin, 1996). Çelikleş ve Hatipoğlu (1997) tarafından arpa üzerine yapılan bir çalışmada, anter tepki oranı % 0.00-1.31 arasında değişmiştir. Yine, çavdar üzerine yapılan bir çalışmada bu oranın % 0.01-% 0.20 arasında olduğu bildirilmiştir. Çavdar üzerine yapılan çalışmalarda çavdarın uygulanan işlemlere karşı zor tepkime veren bir tür olduğu ve embriyonik kallus oranının düşük oranda kaldığı farklı araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (Wenzel ve ark., 1976; Bajaj, 1983; Milewska-Pawliczuk, 1987; Flehinghaus ve ark., 1991; Guo ve Pulli, 2000).

Genel olarak besin ortamının kompozisyonu inorganik besin maddeleri, hormonlar ve şeker olmak üzere 3 unsurdan oluşmaktadır. Tahıllarda uygun ortamı belirlemek zordur. Türler hatta genotipler, farklı besin ortamlarına ihtiyaç duyabildiklerinden dolayı genel bir öneri verilememektedir. Anter kültürü tekniğinde başarıya ulaşılabilmesi için üzerinde çalışılan genotipe göre optimum başlangıç ve rejenerasyon kültür ortamları belirlenmelidir (Dağüstü, 2002). Bu amaçla yürütülen çalışmada modifiye edilmiş N₆ ortamına değişik araştırmacılar tarafından önerilen hormon ve dozları ilave edilmiştir. Araştırmada kullanılan hormonların (2,4-D, IAA ve kinetin) anter tepki oranına ve kallus büyüklüğüne etkileri önemli bulunmuş, genel olarak incelenen özellikler üzerine 2,4-D ve IAA'nin etkileri benzer olmuş ve kinetin uygulamasına göre daha olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Nitekim değişik bitkiler üzerinde yapılan çalışmalarda, anter kültüründe kallus oluşumu ile bitki rejenerasyonunda oksinler (IAA, IBA, NAA ve 2,4-D) ve sitokininler (kinetin, BAP, zeatin vs) ortamlara ilave edilmiştir. Araştırma sonuçlarında büyüme düzenleyicilerinin etkisinin, bitki türüne ve diğer uygulamalara göre değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. Nitekim buğday üzerine yapılan çalışmalarda, 2,4-D ilavesinin anterden kallus oluşumu üzerine olumlu etki yaptığı ve polen

embriyoidlerinin gelişimini sağladığı otaya konulmuştur (Dube, 1984; Chu ve Hill, 1988). Yine, arpada farklı konsantrasyonlarda 2,4-D içeren (2, 4, 6, 8 mg/l) N₆ ortamı kullanılmış, tepki gösteren anter oranının genotipe göre değiştiği, kallus oluşumu üzerine 2,4-D'nin etkisi olmadığı belirlenmiştir (Çeliksaş ve Hatipoğlu, 1997). Kültür ve yabani yulaf üzerine yapılan diğer bir çalışmada, 2,4-D ve kinetinin etkileri incelenmiştir. Her iki genotipte de embriyo üretimi 2,4-D'nin yüksek konsantrasyonlarından (5-6 mg/l) elde edilmiş, kinetinin yüksek konsantrasyonları ise bozulmalara neden olmuştur (Kiviharju ve Tauriainen, 1999). Çeltik üzerine yapılan diğer bir çalışmada oksinlerin kallus oluşumu için gerekli olduğu oksin konsantrasyonu ve çeşidinin kallus oluşumunu etkilediği, en fazla kallus oluşumunun 10.74 µM NAA uygulamasında elde edildiği bildirilmiştir (Trejo-Tapia ve ark., 2002).

Diğer araştırmacıların bulgularına benzer olarak tepki gösteren anter oranı, kallus oluşturan anter oranı ve kallus büyüklüğü üzerine tüm faktörlerin birlikte etkileşimleri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Bu durum invitro ortamında yapılan çalışmalarda, birçok faktörün kültür ortamındaki rejenerasyon üzerine etkili olduğunu göstermektedir.

Bahsedilen tüm bu faktörler dışında, doğrudan tespit edemediğimiz diğer ortam şartları da anterlerden elde edilebilecek başarıyı etkileyebilmektedir. Nitekim donör bitkilerin yetiştirme koşulları (Dodds ve Roberts, 1985), çevre şartları, kültür ortamı (Jing ve Hu, 1987; Li ve ark., 1991) ve kültüre alınan anter yoğunluğu (Cho ve Zapata, 1990) gibi faktörler kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonunu etkilediği değişik araştırmacılar tarafından ileri sürülmüştür. Bu sonuçlar, anter kültürü çalışmalarında bahsedilen faktörlerin olumsuz etkilerini azaltılması yönünde de araştırmaların yapılmasının yararlı olacağını göstermektedir.

Sonuç olarak, çavdarda haploid bitkilerin elde edilmesi amacıyla yapılan anter kültürü çalışmasında, incelenen özelliklerin uygulanan faktörlere göre önemli değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. Genel olarak değerlendirme yapıldığında, soğuk uygulamasında karbon kaynağı olarak maltoz ve hormon olarak da 2,4-D ya da IAA

kullanımlarında daha yüksek oranda kallus değerleri elde edilmiştir. Ploidi grupları içinde ise kullanılan besin ortamının diploidler için daha uygun olduğu belirlenmiştir.

6. KAYNAKLAR

- Abe, T., Futsuhara, Y., 1986. Genotypic Variability for Callus Formation and Plant Regeneration in Rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 72: 3-10.
- Afza, R., Shen, M., Zapata-Arias, F.J., Xie, J., Fundi, H.K., Lee, K.S., Bobadilla-Mucino, E., Kodym, A., 2000. Effect of Spikelet Position on Rice Anther Culture Efficiency. *Plant Science*. Volume 153, Issue 2, pp. 155-159.
- Altamura, M.M., Cercosimo, A., Majoli, C., Crespan, M., 1992. Histological Study of Embryogenesis from Anthers of *Vitis rupestris* du Lot cultured *In vitro*. *Protoplazma* 171, 134-141.
- Anonymous, 2004. Food and Agricultural Organization. www.fao.org.tr.
- Bajaj, Y.P.S., 1983. In Vitro Production of Haploids. In: *Handbook of Plant Cell Culture Vol.1*, D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato, Y. Yamada(eds.), Macmillan Publishing Company New York, s. 228-287.
- Ball, S.T., Zhou, H., Konzak, C.F., 1993. Influence of 2,4-D, IAA, and Duration of Callus Induction in Anther Cultures of Spring Wheat. *Plant Sci.* 90: 195-200.
- Bei, B.H., 1992. *Plant Physiology* China Forestry Press, Beijing.
- Bohorova, N., 1988. Application of Tissue and Protoplasts Culture in the Genus *Helianthus* L. *Proceedings of the 12 th International Sunflower Conference*. Novi Sad, Yugoslavia, July 25-29, I: 300-304.
- Bourgin, J.P., Nitsch, J.P., 1967. Obtention de *Nicotiana* Haploides a Partir Detamines Cultivees *In Vitro*. *Ann. Pysiol. Veget.*, 9, 377-382.
- Bullock, W.P., Baenziger, P.S., 1982. Anther Culture of Wheat: *Triticum aestivum* L. F1's and Their Reciprocal Crosses. *Theor. Appl. Genet.* 62: 155-159.
- Chen, Y., 1988. In Vitro Development of Plant from Microspores of Rice. In: Hu, H. and Chen, Y. Editors, *Plant Somatic Genetic Genetics and Crop Improvement*. Beijing University Press, Beijing. pp. 27-67.
- Cho, M.S., Zapata, F.J., 1990. Plant Regeneration from Isolated Microspores of Indica Rice. *Plant Cell Physiol.* 31: 881-885.

- Choo, T.M., Reinbergs, E., Kasha, K.J., 1985. Use of Haploids in Breeding Barley. *Plant Breed Rev* 3, 220-252.
- Chu, C.C., Hill, R.D., 1988. An Improved Anther Culture Method for Obtaining Higher Frequency of Pollen Embryoids in *Triticum aestivum* L. *Plant Science*. Volume 55, Issue 2, pp. 175-181.
- Çeliktaş, N., Hatipoğlu, R., 1997. Arpa (*Hordeum vulgare* L.) Anter Kültüründe Genotip, Soğuk Uygulama Süresi ve Besi Ortamı 2,4-D İçeriğinin Etkisi. *Ç. Ü. Z. F. Dergisi*. 12 (2): 163-172.
- Dağüstü, N., 2002. Factors Affecting the Anther Culture of Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biotechnology&Biotechnological Equipment*.
- Daniel, G., 1993. Anther Culture in Rye: Improved Plant Regeneration Using Modified MS-Media. *Plant Breeding*. 110, 259-261.
- Day, A., Ellis, T.H.N., 1984. Chloroplast DNA Deletions Associated with Wheat Plants Regenerated from Pollen: Possible Basis for Maternal Inheritance of Chloroplasts. *Cell* 39: 359-368.
- Dedicova, B., Zofajova, A., Matusik, M., Pretova, A., 1999. Anther Cultures of Barley. *Biologia-Bratislava*. 54: 1, 91-99.
- Deimling, S., Flehinghaus-Roux, T., 1996: Haploidy in Rye. In: Jain, S.M., Sopory, S.K., Veilleux, R.E. (eds), *In Vitro* Haploid Production in Higher Plants, Vol. 4, 181-204. Kluwer Academic Publ., Dordrecht.
- Dodds, J.H., Roberts, L.W., 1985. *Experiments in Plant Tissue Culture*. Cambridge University Press, New York.
- Dube, S.D., 1984. Genotypic Differences for Callus Formation in Immature Anthers of Wheat. *Crop-Improvement*. 11: 1, 64-65.
- Dunwell, J. M., Francis, R. J., Powell, W., 1987 Anther Culture of *Hordeum vulgare* L. A Genetic Study of Microspore Callus Production and Differentiation. *Theor. Appl. Genet.*, 74: 60-64.
- Ekingen, H.R., 1994. Bitki Islahı. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü. Ders Notları No: 31. Bursa.
- El Haddoury, J., Chlyah, H., Picard, E., 1993. Etude de l'Effet de Quelques Facteurs Génotypiques et Environnementaux de l'Androgenèse *In Vitro* Chez des

Variétés de Blé Tendre Adaptées Au Maroc. In: AUPELF-UREF (ed) Le Progrés Génétique Passe-t-il par le Repérage et l'Inventaire des Gènes? (p 221-232). John Libbey Eurotext, Paris.

Elliältiođlu, Ő., Tıprıdamaz, R., 1997. Soğuk Uygulamaları ve Aktif Kmrn Patlıcan ve Biberde *In Vitro* Androgenesis Üzerine Etkileri. TBİTAK-TOGTAG 87 No'lu proje Sonuç Raporu, 70s, Ankara.

Engin, G., 1991. *Triticum aestivum* zerinde Anter Kültürü alışmaları (Yüksek Lisans Tezi). Ana. ni. Fen Bil. Ens., Eskişehir.

Er, C., Canpolat, N., 1992. Bitki Islahında Doku Kültürleri. T.C. Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı. Ankara.

Fadel, F., Wenzel, G., 1990. Medium-Genotype-Interaction on Androgenetic Haploid Production in Wheat. *Plant Breeding* 105: 278-282.

Fang, G.H., Liang, H.M., 1985. Studies on Function of Cold Pretreatment Affecting the Efficiency of Rice Anther Culture. *Acta-Phytophysiologica-Sinica*. 11: 4, 366-380.

Flehinghaus, T., Deimling, S., Geiger H.H., 1991. Methodical Improvements in Rye Anther Culture. *Plant Cell Reports* 10: 397-400.

Flehinghaus-Roux, T., Deimling, S., Geiger, H.H., 1995. Anther-Culture Ability in *Secale cereale* L. *Plant Breed.* 114, pp. 259-261.

Foroughi-Wehr, B., Zeller, F.J., 1990. *In Vitro* Microspore Reaction of Different German Wheat Cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 79: 77-80.

Genovesi, A.D., Maggill, C.W., 1979. Improved Rate of Callus and Green Plant Production from Rice Anther Culture Following Cold Shock. *Crop Sci.* 19: 662-664.

Gnlşen, N., 1987. Bitki Doku Kltrleri Yntemleri ve Uygulama Alanları. Ege Tarımsal Araş. Enst. Md. Yay. No: 78. Menemen İzmir.

Guha, S., Maheshwari, S.C., 1964. *Nature* (London), 204, p. 497.

Guo, Y.D., Pulli S., 2000. Isolated Microspore Culture and Plant Regeneration in Rye (*Secale cereale* L.). *Plant Cell Rep.* 19: 875-880.

- Gürel, A., Tosun, M., Demir, İ., 1992. Arpa Islahında Haploidi Teknikleri ve Anter Kültürünün Önemi. 2. Arpa-Malt Semineri. 25-27 Mayıs. Konya. 312-326 s.
- Gürel, A., Tosun, M., Demir, İ., 1993. Bazı Makarnalık ve Ekmeklik Buğday Genotiplerinin Anter Kültürüne Reaksiyonları. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bornova. İzmir. Anadolu, J. of AARI. 2, 98-111.
- Gürel, A., 1994. Susam (*Sesamum indicum* L.)' da Anter Kültürü. Tarla Bitkileri Kongresi. E.Ü. Ziraat Fakültesi. 25-29 Nisan. Bornova.
- Hatipoğlu, R., Genç, İ., 1992. Tahıl Islahında Biyoteknolojik Yöntemlerin Kullanılma Olanakları. Ç.Ü.Z.F. Dergisi, 7, (2) : 189-204.
- Hatipoğlu, R., 1993. Biyoteknolojiye Giriş. Ç.Ü.Z.F., Ders Kitabı. No: 129. Adana.
- Hatipoğlu, R., Sakin, M.A., 1996. Tütün (*Nicotiana tabacum*) Anter Kültüründe Genotip ve Besi Ortamının Haploid Bitki Oluşumuna Etkileri Üzerinde Araştırma. Ç.Ü.Z.F. Dergisi. 11 (4): 107-116.
- He, D.G., Quyang, J.W., 1984. Callus and Plantlet Formation from Cultured Wheat Anthers at Different Developmental Stages. *Plant Sci. Lett.* 33, pp. 71-79.
- Heberle-Bors, E., Stöger, E., Touraev, A., Zarsky, V., Vicente, O., 1996. In Vitro Pollen Cultures: Progress and Perspectives. In: Mohapatra, S.S., Knox, R.B.(eds) Pollen Biotechnology. Gene Expression and Allergen Characterization (pp 85-109). Chapman and Hall, New York.
- Henry, Y., Vain, P., De Buyser, J., 1994. Genetic Analysis of In vitro Plant Tissue Culture Responses and Regeneration Capacities. *Euphytica*79: 45-58.
- Hu, H., Li, W.Z., Jing, J.K., 1991. Anther/Pollen In Vitro Culture on Barley. In: Barley Genetics VI, Proc. 6th Int. Barley Genetic Symp., Helsingborg, pp. 203-205.
- Huang, B., Sunderland, N., 1982. Temperature-stress Pretreatment in Barley Anther Culture. *Ann. Bot.* 49: 77-88.
- Hunter, C.P., 1987. Europ. Patent Application No 0 245 898 A2, 1-8.
- Immonen, S., Anttila, H., 1996. Success in Anther Culture of Rye. *Vortr. Pflanzenzüchtg.* 35: 237-244.

- Immonen, S., Anttila, H., 1998. Impact of Microspore Developmental Stage on Induction and Plant Regeneration in Rye Anther Culture. *Plant Science*. 139: 2, 213-222.
- Immonen, S., 1999. Androgenetic Green Plants from Winter Rye, *Secale cereale* L., of Diverse Origin. *Plant Breeding* 118, 319-322.
- Immonen, S., Anttila, H., 1999. Cold Pretreatment to Enhance Green Plant Regeneration from Rye Anther Culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 57: 121-127.
- Ingram, D. S. 1980. Tissue Culture Methods in Plant Pathology. *Tissue Culture Methods for Plant Pathologist*. Blackwell Sci. Publ. 3 s.
- Jain, S.M., Sopory, S.K., Veilleux, R.E. (eds), 1996: *In Vitro* Haploid Production in Higher Plants, Vol. 4: Cereals. Kluwer Academic Publ., Dordrecht.
- Jänhe, A., Lazzeri, P.A., Jäger-Gussen M., Lörz. 1991. Plant Regeneration from Embryogenic Cell Suspensions Derived from Anther Cultures of Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* 82: 74-80.
- Jing, J., Hu, H., 1987. Anther and Immatura Inflorescence Culture in *Hordeum vulgare*. In: *Embryology of Angiosperms*, pp. 743-752. (Ed. by B.M.Johri), Springer –Verlag.
- Johansson, L., 1983. Effects of Activated Charcoal in Anther Cultures. *Physiologia-Plantarum*. 59: 3, 397-403.
- Johri, B.M., Rao, P.S., 1984. Experimental Embryology: Anther and Pollen Culture. In: *Embryology of Angiosperms*, pp. 743-752. (Ed. by Johri, B.M.), Springer-Verlag.
- Kandeler, R., 1987. die Gewebekulturtechnik. Univ. Für Bodenkultur, Institut für Botanik, Wien-Österreich.
- Kiviharju, E., Pehu, E., 1998. The Effect Cold and Heat Pretreatments on Anther Culture Response of *Avena sativa* and *A. sterilis* Plant Cell Tiss. Org. Cult. 54: 97-104.
- Kiviharju, E. M., Tauriainen, A. A., 1999. 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid and Kinetin in Anther Culture of Cultivated and Wild Oats and Their Interspecific Crosses : Plant Regeneration from *A. sativa* L. *Plant –Cell-Reports*. 18: 7-8, 582-588.

- Knudsen, S., Due, I.K., Andersen, S.B., 1989. Components of Response in Barley Anther Culture. *Plant Breeding*. 103, 241-246.
- Kuhlmann, V., Foroughi-Wehr, B., 1989. Production of Doubled Haploid Lines in Frequencies Sufficient for Barley Breeding Programs. *Plant Cell Rep.* 8: 78-81.
- Kün, E., 1988. Serin İklim Tahılları. Ankara Üni. Ziraat Fak. Yay., 1032, Ders Kitabı, 299-322 s.
- Lachermes, P., 1989. Applied Biotechnology (Cereal Improvement Program). Annual Report for 1989. Int. Center for Agricultural Research in the Dry Areas, Syria, 148-151.
- Larsen, E. T., Tuveson, I. K. D., Anderson, S. B., 1991. Nuclear Genes Affecting Percentage of Green Plants in Barley (*Hordeum vulgare* L.) Anther Culture. *Ther. Appl. Genet.*, 82: 417-420.
- Lazar, M.D., Chen, T.H., Scoles G.J., Kartha K.K., 1987. Immature Embryo and Anther Culture of Chromosome Addition Lines of Rye in Chinese Spring Wheat. *Plant Sci.* 51: 77-81.
- Lezin, F., Sarrafi, A., Alibert, G., 1996. The Effects of Genotype, Ploidy Level and Cold Pretreatment on Barley Anther Culture Responsiveness. *Cereal-Research-Communications*. 24: 1, 7-13.
- Li, A., Shao, Q., De, W., Yu, J., Cao, L., Fu, Z., Lin, X., Xu, W., 1991. Studies on Malting Barley Anther Culture. In: *Barley Genetics VI, Proc. 6th. Int. Barley Genetics Symp.*, Helsingborg, pp. 209-210.
- Liang, G.H., Xu, A., Hoang Tang, 1987. Direct Regeneration of Wheat Haploids via Anther Culture. *Crop Sci.* 27: 336- 339.
- Lorenz, I., 1989. Ergebnisse zur Induktion der Androgenetischen Entwicklung in Winterroggenantheren. *Arch. Züchtungsforsch.* 6, pp. 415-420.
- Ma, R., Guo, Y.D., Pulli, S., 2004. Comparison of Anther and Microspore Culture in the Embryogenesis and Regeneration of Rye (*Secale cereale* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 76: 147-157
- Marciniak, K., Banaszak, Z., Wedzony, M., Brykczynska, L., 1998. The Influence of P2, MN6 ve C17 Media and Maltose or Sucrose on the Efficiency of Triticale

- Androgenesis. Biuletyn-Instytutu-Hodowli-i-Aklimatyzacji-Roslin. No. 205-206, 137-141.
- Mikami, T., Kinoshita, T., 1988. Genotypic Effects on the Callus Formation from Different Explants of Rice, *Oryza sativa* L. Plant Cell Tiss. and Org. Cult. 12: 311-314.
- Milewska-Pawliczuk, E., 1987. Induction of Androgenesis *In Vitro* in Various Genetic Forms of *Secale cereale*. Biol. Plant. 29: 295-298.
- Morrison, R.A., Koning, R.E., Evans, D.A., 1986. Anther Culture of an Interspecific Hybrid of Capsicum, J. Plant Physiol. 126, 1-9.
- Nitsch, C., 1983. Pollen culture a new technique for mass production of haploid and homozygous plant: physiologie Pluricellulaire C.N.R.S. Gif France.
- Petolino, J.F., Jones, A.M., 1986. Anther Culture of Elite Genotypes of Maize. Crop Sci. 26: 1072-1074.
- Pierik, R.L.M., 1987. In Vitro Culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht.
- Powell, W., 1988. The Influence of Genotype and Temperature Pretreatment on Anther Culture Response in Barley (*Hordeum vulgare* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 12: 291-297.
- Rakoczy –Trojanowska, M., Śmiech, M., Malepszy, S., 1997. The Influence of Genotype and Medium on Rye (*Secale Cereale* L.) Anther Culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 48: 15-21.
- Sağsöz, S., Akgün, İ., Tosun, M., 1997. Sitogenetik Laboratuvar Rehberi. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Yayınları. No:150.
- Saidi, N., Cherkaoui, S., Chlyah, A., Chlyah, H., 1997. Embryo Formation and Regeneration in *Triticum turgidum* ssp. *durum* Anther Culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 51: 27-33.
- Salunkhe, C.K., Rao, P.S., Mhatre, M., 1999. Plantlet Regeneration via Somatic Embryogenesis in Anther Callus of *Vitis latifolia* L. Plant Cell Rep., 18, 670-673.

- Shahjahan, A.K.M., Karim, N.H., Nahar, M.A., Hoque, M.Z., Miah, S.A., 1992. Studies on the Callus Induction Efficiency of Rice (*Oryza sativa* L.) Anthers. Bangladesh J. Bot. 21, pp. 239-246.
- Shimada, T., Otani, M., Ikuta, Y., 1999. Investigation of the Callus Induction Medium and the Regeneration Medium in Rice Anther Culture. Japanese-journal-of-Crop-Science. 68: 1, 151-154.
- Silva, A.L.S.-de, Fernandes, M.I.F.B.-de, Arias, G., Ferreira, A.G., Haas, J.C., Da-Silva, A.L.S., Fernandes, M.I.F., 1997. Production of Androgenetic Barley Doubled Haploid Lines. Producao de Linhagens Duplo-Haploides Androgeneticas de Cevada. Pesquisa-Agropecuaria-Brasileira. 32: 11, 1159-1166.
- Škoric, D., 1993. Wild Species Use in Sunflower Breeding Results and Future Directions. FAO/IBPGR Plant Genetic Resources Newsletter, 93: 17-23.
- Snape, J.W., 1989. Doubled Haploid Breeding: Theoretical Basis and Practical Applications. In: Mujeeb- Kazi A, Sitch, L. A (eds). Review of Advances in Plant Biotechnology, 1985- 1988. 2nd Int Symp Genetic Manipulation in Crops. Mexico and Manila, CIMMYT and IRRI, p: 19-30.
- Sorvari, S., Schieder, O., 1987. Influence of Sucrose and Melibiose on Barley Anther Cultures in Starch Media. Plant Breeding, 99: 164-171.
- Stamp, J.A., Meredith, C.P., 1988. Somatic Embryogenesis from Leaves and Anthers of Grapevine., Scientia Horticulturae, 35, 235-250.
- Straub, J., 1977. Plant Tissue Culture and Its Bio-technological Application, (J. Straub, Ed.), Springer-Verlag, 334-340.
- Szarejko, I., Kasha, K.J., 1991. Induction of Anther Culture Derived Doubled Haploids in Barley. Cer. Res. Comm. 19 (1-2): 219-237.
- Thomas, E., Hoffmann, F., Wenzel, G., 1975. Haploid Plantlets from Microspores of Rye. Z. Pflanzenzüchtg. 75: 106-113.
- Trejo-Tapia, G., Amaya, U.M., Morales, G.S., Sánchez, A.D.J., Bonfil, B.M., Rodríguez-Monroy, M., Jiménez-Aparicio, A., 2002. The Effects of Cold-pretreatment, Auxins and Carbon Source on Anther Culture of Rice. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 71: 41-46.

- Trottier, M.C., Collin, J., Comeau, A., 1993. Comparison of Media for their Aptitude in Wheat Anther Culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 35: 59-67.
- Vasil, I.K., 1980. Androgenetic Haploids. In: *Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture Supplement*, 11A Int. Review of Cytology, Academic Press, New York. pp.195-213.
- Veilleux, R.E., 1994. Development of New Cultivars via Anther Culture. *Hortscience*, vol 29 (11), 1238-1241.
- Vidalie, H., 1984. *La Culture In Vitro et Ses Applications Horticoles*. Tech. Docum. Lavoisier, Paris, 151p.
- Wang, Z.Y., Ge, Y., Mian, R., Baker, J., 2005. Development of Highly Tissue Culture Responsive Lines of *Lolium temulentum* by Anther Culture. *Plant Science*. Volume 168, Issue 1, pp. 203-211.
- Wenzel, G., Thomas, E., 1974. Observations of the Growth in Culture of Anthers of *Secale cereale* L. *Z. Pflanzenzuchtg.* 72, pp. 89-94.
- Wenzel, G., Hoffmann, F., Thomas, E., 1976. Heterozygous Microspore-Derived Plants in Rye. *Theor. App Genet.* 48: 205-208.
- Wenzel, G., Hoffmann, F., Thomas, E., 1977. Increased Induction and Chromosome Doubling of Androgenetic Haploid Rye. *Theor. Appl. Genet.* 51 (1977), pp. 81-86.
- Wenzel, G., Foroughi-Wehr, B., 1990. In: Knauer, N., Kranz, J., Langholz, H.J., Thoroe, C., Werner, W. (eds). *Agrarspectrum Schriftenreihe*, vol.17, Verlagsunion Agrar, pp 85-98.
- Xie, J.H., Gao, M.W., Liang, Z.Q., Shu, Q.Y., Cheng, X.Y., Xue, Q.Z., 1997. The Effect of Cool-pretreatment on the Isolated Microspore Culture and the Free Amino Acid Change of Anthers in Japonica Rice (*Oryza sativa* L.). *J. Plant Physiol.* 151: 79-82.
- Yıldırım, M.B., Yıldırım, Z., Çaylak, Ö., 1990. Patateste Anter Kültürü Yoluyla Haploid Elde Edilmesi. *Doğa Tr. J. of Agriculture and Forestry*. Tübitak.14, 543-554.

- Yin, K.C., Hu, C., Chun, C.Y., Pi, F.Y., Wang, S.T., Liu, T.Y., Chu, C.C, Wang, C.C., Sun, C.S., 1976. A Study of the New Cultivars of Rice Raised by Haploid Breeding Method. *Sci. Sin.* 19, pp. 227-242.
- Zhou, H., Konzak, C.F., 1989. Improvement of Anther Culture Methods for Haploid Production in Wheat . *Crop Sci.* 29: 817-821.
- Zhou, H., Zheng, Y., Konzak, C.F., 1991. Osmotic Potential of Media Affecting Green Plant Percentage in Wheat Anther Culture. *Plant Cell Rep.* 10: 63-66.
- Zhou, H., 1996. Green Plant Regeneration from Anther Culture in Cereals, in: Jain, S.M., Sopory, R.E., Veilleux (Eds.), *In Vitro Haploid Production in Higher Plants*. Vol. 2, Kluwer Academic, Dordrecht. pp. 169-187.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı :Nüket ALTINDAL

Doğum Yeri : Dalaman-Köyceğiz/MUĞLA

Doğum Yılı : 1976

Medeni Hali : Bekar

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise 1990- 1993 : Dalaman Lisesi

Lisans 1995- 1999 : Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü

Yabancı Dil : İngilizce

İş Deneyimi :

Çalışmıyor.