

TRİTİCUM AESTIVUM L. (Buğday) ÜZERİNDE
ANTER KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI

Gönül ENGİN
Ziraat Mühendisi

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalı
Botanik Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman : Doç.Dr.Süleyman TOKUR

Anadolu Üniversitesi
Merkez Kütüphane

Anadolu Üniversitesi

Gönül ENGİN'in YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı
"TRITICUM AESTIVUM L. (Buğday) ÜZERİNDE ANTER KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI"
başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğinin ilgili
maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

28./1./1991

Üye : Doç. Dr. Süleyman TOKUR (Danışman)

Üye : Doç. Dr. Hüseyin MISIRDALI

Üye : Yar. Doç. Dr. Ayşen ÖZDEMİR

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

.31./..01./ 1991 gün ve 266./5./ sayılı kararıyla
onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Rüstem KAYA

ÖZET

Anter kültürü tekniğinin kullanımı ile bitkilerden homozigot hatlar kolaylıkla elde edilmektedir. Bunlar gerek genetik araştırmalarda, gerekse tarım alanında geniş bir kullanıma sahiptirler.

Haploid bitkilerin elde edilmesi ise 3 aşamada gerçekleşmektedir.

1. Embryoid oluşumu
2. Bitki regenerasyonu
3. Bitki gelişimi.

Genotipleri birbirinden farklı T.aestivum (Buğday)'un 6 kültür çeşidi üzerinde yapılan anter kültürü çalışmaları sonucunda; genotipin, embryoid oluşturma yeteneği üzerinde etkili olduğu saptanmıştır. Buna bağlı olarak 2 no'lu (Bw.5) kültür çeşidinde embryoid oluşumu en yüksek, 3 no'lu (Bw.8) kültür çeşidinde ise en düşük olduğu görülmüştür. Diğer çeşitlerde ise embryoid oluşumu bu değerler arasındadır.

Anter kültürü çalışmaları esnasında bir problem olarak karşımıza çıkan albino bitkilerin oluşumunun da hem genetik hem de çevresel faktörlere bağlı olduğu görülmüştür. 1 no'lu (Bw.2) ve 2 no'lu (Bw.5) çeşitler 18°C de yetiştirildiklerinde albino bitki oluşmadığı halde, 23°C de ortaya çıkmışlardır. 4 no'lu (Bw.9) çeşit ise 18°C de albino bitki oluşturduğu halde, 23°C de oluşturmamıştır.

Her iki araştırma çeşidinin de embryo verimi katı besi ortamı üzerinde yüksek olmuştur fakat, albino bitkilerin oluşum frekansında da bir artış gözlenmiştir.

Bu çalışmada elde olunan bulgulara göre, anter kültürü çalışmaları sonunda elde edilen gerek albino, gerekse yeşil bitkilerin meydana gelmesi başta genotip olmak üzere çevre koşulları ile kullanılan besi ortamına bağlı olduğu anlaşılmıştır.

SUMMARY

Homozygous lines are obtained from wheat (*T.aestivum*) via anther culture easily.They are used both genetic researches and in agriculture widely.

Haploids via anther culture are produced by a three-step procedure.

1. Embryoid induction
2. Plant regeneration
3. Plantlet development.

The Performans in anther culture of 6 genotypes of bread wheat on embryoid induction;genotype,the effects of temperature growth conditions on donor plants,the effects of liquid,semi-solid and solid media.6 genotypes were examined and it is shown that genotypes produced different frequency of embryoid induction.Bw5 had the highest but,Bw.8 had the lowest frequency of embryoid induction. The performans of other genotypes are intermediate .

The albino plantlet formation is serious problem in anther culture.It occurs being connected with genetic and growth conditions. There isn't any plantlet formation when Bw.2 and Bw.5 were grown at 18°C but they had albino Plantlets at 23°C.On the contrary,Bw.9 had albino plantlets at 18°C but not at 23°C.

Both of research material had the highest embryoid induction on solid medium but,it is observed rising of albino plantlet also.

The results showed that both albino and green plants formation frequency depends on genotype,growth conditions and medium structure.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans çalışması için beni teşvik eden değerli müdürüm Dr.Fahri ALTAY'a,doku kültürü çalışmalarına adım atılmasını destekleyen değerli bilgi ve uyarılarını esirgemeyen hocam,Sayın Doç.Dr.Süleyman TOKUR'a,Sayın Prof.Dr.Yalçın ŞAHİN başta olmak üzere Biyoloji bölümünün diğer öğretim elemanlarına teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarının yapılabilmesi için bize her türlü kolaylığı sağlayan Tarım Orman ve Köy İşleri Bakanlığı yetkililerine,çalışmalarımıza olanak sağlayan Uluslararası Kuru Alanlarda Tarımsal Araştırma Merkezi (ICARDA) yetkililerine özellikle Dr.Habib KETATA, Muhammed TAHİR ve çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen Dr.Philippe LASHERMES,Dr.Masanori İNAGAKİ,Ergun ÖZDEMİR,Wafa JOUMA'ya teşekkür etmeyi ödev sayarım.

Özellikle,çalışmalarım süresince bana her zaman destek veren ve yardımcı olan sevgili eşim Ziraat Yüksek Mühendisi Derviş ENGİN'e,ayrıca mesai arkadaşlarım Havva KIRAÇ ve Visal ÖZBEK'e de bu vesile ile şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZET	
SUMMARY	
TEŞEKKÜR	
1. <u>GİRİŞ</u>	1
1.1. ANTER DONOR BİTKİLERİNİN GENOTİPİ	3
1.2. ANTER DONOR BİTKİLERİN YETİŞTİRİLDİĞİ ÇEVRE KOŞULLARI	4
1.3. POLEN GELİŞME DEVRESİ	5
1.4. BAŞAKLARIN VERNELİZASYONU (Ön Uygulama).....	5
1.5. BESİ ORTAMLARININ BİLEŞİMLERİ	7
1.5.1. Besi Ortamlarının Fiziksel Özellikleri	8
1.6. ANTER KÜLTÜRÜNÜN ORTAM (İnkübasyon) ŞARTLARI	9
1.7. ALBİNİZM	10
2. <u>MATERYAL VE METODLAR</u>	11
2.1. MATERYAL	11
2.2. METODLAR	12
2.2.1. Donor Bitkilerin Elde Edilmesi	12
2.2.2. Başakların Hasat Edilmesi	13
2.2.3. Ön Uygulama	14
2.2.4. Besi Ortamlarının Hazırlanması	14
2.2.5. Anterlerin İnokülasyonu	15
2.2.6. Bitkilerin Saksılara Şaşırtılması	25
2.2.7. Kolşisin Uygulaması	27
2.2.8. Verilerin Değerlendirilmesi	27
3. <u>BULGULAR</u>	28
3.1. ANTERLERDEN OLUŞAN HÜCRE YIĞINLARI	28
3.2. BUĞDAYDA ANTER KÜLTÜRÜ ÜZERİNE GENOTİPİN ETKİSİ	28
3.3. DONOR BİTKİLERİN YETİŞTİRİLDİĞİ ÇEVRE İSİSİNİN EMBRYOİD OLUŞUMU VE BİTKİ GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİSİ	29
3.4. EMBRYOİD OLUŞUMU ÜZERİNE BESİ ORTAMININ ETKİSİ	29

4. <u>SONUÇLAR VE TARTIŞMA</u>	34
4.1. ANTERLERDEN OLUŞAN HÜCRE YIĞINLARI	34
4.2. BUĞDAY'DA ANTER KÜLTÜRÜNÜN ÜZERİNE GENOTİPİN ETKİSİ	34
4.3. DONOR BİTKİLERİNİN YETİŞTİRİLDİĞİ ÇEVRE İSİSİNİN EMBRYOİD OLUŞUMU VE BİTKİ GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİSİ	35
4.4. EMBRYOİD OLUŞUMU ÜZERİNE BESİ ORTAMININ ETKİSİ	36
5. <u>KAYNAKLAR DİZİNİ</u>	37

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>SAYFA</u>
Şekil 1. Buğdaygillerde Mikrosporun Gelişme Devreleri	6
Şekil 2. Uygun Devredeki Bir Başak	13
Şekil 3. Üzerinde Hücre Yığınları Oluşmuş Bir Anterin Görünüşü	28
Tablo 1. Çalışmada Kullanılan Buğday Çeşitleri	11
Tablo 2. Başlangıç Besi Ortamları	17
Tablo 3. Regenerasyon Besi Ortamı	21
Tablo 4. Bitki Geliştirme Besi Ortamı	24
Tablo 5. Buğday Çeşitlerinin Anter Kültüründeki Performansları	30
Tablo 6. Ambryoid ve Bitkiciklerin Oluşumu Üzerine Anter Donor Bitkilerin Yetiştirildikleri Çevre Isısının Etkisi	31
Tablo 7. Buğday Anter Kültürü Üzerine Katı, Yarı-Katı ve Sıvı Besi Ortamlarının Etkisi	33
Grafik 1. Buğday Anter Kültürü Üzerine Katı, Yarı-Katı ve Sıvı Besi Ortamlarının Etkisi	32
Resim 1. Ser'a Şartlarında Donor Bitkilerin Yetiştirilmesi.....	12
Resim 2. Ön İşlem İçin Hazırlanmış Başaklar	14
Resim 3. Başakların İnokulasyon için hazırlanması	15
Resim 4. Uygun Devredeki Mikrosporlar	16
Resim 5. Laminar Akımlı Steril Çalışma Kabini ve İçlerinde Besi Ortamı Bulunan Kaplar	18
Resim 6. Laminar Akımlı Steril Kabin İçinde Başaklardan Anterlerin Temini	18
Resim 7. İnoküle Edilmiş Anterler	19
Resim 8. İnoküle Edilmiş Anterin Yakından Görünüşü	19
Resim 9. İnokülasyona Tabi Tutulan Kültürler	20
Resim 10. Anterlerin Üzerinde Hücre Yığınlarının Oluşumu	20

Resim 11. "Regenerasyon Besi Ortamı" na Aktarılacak Hale Gelmış Embryoidlerin Görünüşü	22
Resim 12. "Regenerasyon Besi Ortamı"na Aktarılmış Bir Embryoidin Görünüşü	22
Resim 13. Embryoid'den Regenere Olan Bitkicik Taslakları	23
Resim 14. " Bitki Geliştirme Besi Ortamı'na Aktarılmaya Uygun Bitkicik	23
Resim 15. Kültür Geliştirme Odasında, Gelişmelerini Sürdüren Bir Grup Bitkiden Görünüş	25
Resim 16. Topraka Şaşırtılacak Büyüklüğe Erişmiş Bitkilerden İkisi	26
Resim 17. Serâ Şartlarına Alınan Saksılanmış Bitkiler	26

1. GİRİŞ

Bundan on bin yıl önce, bitki ve hayvan ıslahıyla başlayan, bugün adına BİYOTEKNOLOJİ dediğimiz olgu günümüzde; Doku Kültürleri, Gen Teknolojisi, Enzim ve Fermantasyon Teknolojisi v.b. değişik çalışmalarını kendine konu edinmiştir.

Dünya nüfusunun sürekli olarak artması ve kısıtlı kaynakların gün geçtikçe tükenmesi karşısında, bitkisel ürünlere duyulan ihtiyaçların gelecek yıllarda giderek artacağı bilinen bir gerçektir. Bitki doku kültürü çalışmaları; bitkilerin fizyoloji, biyokimya ve genetik yapılarıyla ilgili bilinmeyen birçok konuyu açığa çıkararak, kısa sürede ve sınırlı alanda, bol ve kaliteli ürün elde etmeyi hedeflemiştir. Bugün hücre, protoplast, embryo, ovaryum, polen veya meristem dokusundan in vitro koşullarda tam bir bitki elde etmek sorun olmaktan çıkmıştır. Bitki doku kültürü tekniği ile bitkilerin ıslahı, hızlı üretimi, virüsten arındırılması, uzun süreli muhafazası ve çeşitli metabolitlerin elde edilmesi gerçekleştirilmiştir (GÖNÜLŞEN 1987).

Doku kültürü çalışmalarının bitki ıslahına sağlayacağı katkılardan biri, haploid bitkilerin elde edilmesidir. Bugün, anter veya mikrospor kültürü (FOROUGHİ-WEHR ET AL., 1982; CHU ET AL., 1988), yumurtalık kültürü (YANG ET AL., 1982), türler arası melezleme (JENSEN 1976; INAGAKİ 1985a), kimyasal madde uygulaması (PIERIC 1987b) gibi teknikler kullanılarak haploid bitkiler elde edilebilmektedir. Anter kültürü tekniği ile, olgunlaşmamış anterler yapay besi ortamına inoküle edilerek, mikrosporların kallus veya embryoid oluşturması teşvik edilmektedir. Polen daneleri yapay besi ortamında embryoid bir gelişme gösterirler. Bu gelişme, normal olmayan çevre şartlarının hücrenin tüm gizli enerjisinin (totipotensi) ortaya çıkmasına sebep olması şeklinde açıklanmaktadır. Anter kültürü yoluyla Nicotiana tabacum (Tütün), Capsicum annum (Biber), Solanum melongena (Patlıcan), Brassica oleracea (Lahana), Hordeum vulgare (Arpa), Triticum aestivum (Buğday), Zea mays (Mısır), Oryza sativa (Çeltik), Solanum tuberosum (Patates), yumurtalık kültürü yoluyla Arpa, Buğday, Çeştik, Mısır, Cucumis melo (Kavun), Citrillus vulgare (Karpuz)'larda haploid bitkiler elde edilmiştir.

Türlerarası melezleme tekniği ile ise; T.aestivum'un Hordeum bulbosum veya Zea mays ile melezlenmesinden sonra embryo gelişimi esnasında bulbosum veya mısırdan gelen kromozomların eliminasyonu sonucu elde edilen haploid embryonun, besi ortamında geliştirilmesiyle haploid bitkiler elde edilmiştir. Buğdaygillerde yumurtalık kültürüyle haploid bitki elde edilmesindeki başarı, anter kültürüne göre çok düşüktür. Türlerarası melezleme ise henüz sadece birkaç buğday çeşidinde başarı ile uygulanmaktadır. Buna rağmen, anter kültürü tekniği, yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bunun nedenlerinden biri de bitkilerin ürettikleri polenlerin miktarının çokluğu (DING AND QUYAN QUYANG 1984).

Dünyada ilk kez doğal haploid bitkiler, BLAKESLEE VE ARKADAŞLARI (1922) tarafından saptanmıştır. Ancak, haploid bitkilerin in vitro'da üretimi 1964 yılında Datura innoxia polenlerinden gerçekleştirilmiştir (GUHA AND MOHESWARİ 1964). Daha sonra bunu Nicotiana tabacum, Oryza sativa, Brassica oleracea, Hordeum vulgare ve Lolium multiflorum üzerinde yapılmış anter kültürü çalışmaları takip etmiştir (BOURGİN AND NİTSCH 1967; NİTSCH ET AL., 1969, 1970; CLAPHAM 1971; KAMEYA AND HİNATA 1970). T.aestivum (Buğday) üzerinde ilk anter kültürü çalışmalarına 1970'li yıllarda rastlanmıştır (CHU ET AL., 1973; QUYANG ET AL., 1973; PICARD AND DE BUYSER 1973). İlk çalışmalarda başarılı sonuçlar alınamamışsa da yöntemde yapılan değişiklikler sonucunda haploid buğday bitkileri elde edilebilmiş ve ıslah programlarında kullanılmaya başlanmıştır.

Haploid bitkiler, özellikle genetik araştırmalar ve bitki ıslahı yönünden büyük önem taşımaktadırlar. Geleneksel ıslah yöntemleriyle homozigot diploid bitkilerin elde edilmesi için, uzun zaman isteyen bir seleksiyon ve homozigotlaştırma aşaması gerekmektedir. Bu zaman süreci, bitkilerin çiçek biyolojileri ve üzerinde çalışılan özelliklerin kalıtsal yapısına göre değişmektedir (5-10 yıl). Halbuki haploid bitkilerin kromozomlarının 2 katına çıkarılması 1 generasyonluk süreyi gerektirmektedir. Görüldüğü gibi, anter kültürü tekniği kullanılarak zamandan tasarruf sağlanılmaktadır (DE BUYSER ET AL., 1985; DE BUYSER ET AL., 1987; LIANG ET AL., 1987; PIERİC 1987b). Kendine döllen bitkilerde veya yabancı döllen bitkilerde, zaman alıcı olsa da kendilemelerle homozigotluk sağlanabilmektedir fakat, kendine uyumsuzlarda bunu elde etmek mümkün değildir. Anter kültürü yoluyla bu sorun ortadan kaldırılmaktadır. Diğer taraftan, homozigot diploid

bitkiler genleri ya resessif homozigot yada dominant homozigot olarak içerirler. Arzu edilen resessif karakterli genotiplerin seçimi çok önemlidir. Geleneksel ıslah yöntemleriyle bunların elde edilmesi oldukça zordur. Her generasyonda tek bitki seleksiyonu yapılsa bile heterozigot yapı ve dolayısıyla açılma nedeniyle istenen karaktere sahip bitkiler, istatistiki hatalar veya yeni kombinasyonların gözden kaçmasıyla daha sonraki generasyonlarda kaybedilebilmektedir (DAOFEN 1986). Anter kültürü tekniği kullanılarak, arpa mozaik virüsüne dayanıklılığı sağlayan resessif homozigot genleri içeren genotipe sahip bitkiler üretilmiştir (FOROUGHİ WEHR AND FRIEDT 1984). Anter kültürü tekniğinin diğer bir yararı da besi ortamına inokule edilen gametik hücrelerden rekombinantların veya mutant tiplerin seçilerek geliştirilmesi ve bitki ıslahında kullanılmalarıdır (YE ET AL., 1987; PALSONİ ET AL., 1988).

Anter kültürü tekniğinin kullanımı, özellikle tahıl grubu bitkilerinin ıslah programlarında büyük bir potansiyele sahiptir. Fakat; anter donör bitkilerinin yetiştirilme koşulları, hasat edilen başaklara inokulasyon öncesi uygulanan vernalizasyon işlemi (ön uygulama) polen gelişim devreleri, anter donör bitkilerinin genotipi, besi ortamının bileşimi ve fiziksel yapısı, in vitro koşulları, albinizm gibi faktörler haploidlerin elde edilmesindeki başarıyı sınırlandırmaktadır.

1.1. ANTER DONOR BİTKİLERİN GENOTİPİ

Embryoid oluşumu, bitki regenerasyonu (farklılaşması) ve yeşil bitkilerin gelişim yeteneği, anterlerin alındığı donör bitkilerin genotiplerine bağlıdır. Yukarıdaki bu üç unsurun, farklı ve bağımsız bir genetik mekanizma ile kontrol edilmiş olabileceği açıklanmaktadır (HENRY AND DE BUYSER, 1985). Diğer bir araştırmaya göre ise, bunların sitoplazma ve çekirdekle ilgili genetik faktörler tarafından bağımsız olarak kontrol edilmiş olabileceği görüşü savunularak, yukarıdaki açıklama desteklenmektedir (EKİZ 1990).

Petunya bitkisi üzerinde yaptığı anter kültürü çalışmalarından elde ettiği bulgulara göre RAQUİN (1982), polenlerden embryoid oluşum frekansının, polendeki genler tarafından değil, polen hücrelerini saran diploid yapıdaki dokularda bulunan hücrelerdeki genler tarafından kontrol edildiğini bildirmiştir.

T.aestivum ile ilgili çalışmalarda da aynı sonuç elde edilmiştir (QUYANG ET AL.,1983).Diğer bir araştırmaya göre ise,anter çeperi hücrelerindeki suda çözünebilir protein içeriği ile tapetum hücrelerinin dejenerasyon zamanı genotiplere göre farklılıklar göstermektedir(LIANG ET AL.,1980).

1.2. ANTER DONOR BİTKİLERİNİN YETİŞTİRİLDİĞİ ÇEVRE KOŞULLARI

Anter donör bitkilerinin içinde buldukları çevre koşulları da anter kültürünün başarısı üzerine etkili olmaktadır.Çevre koşulları olarak özellikle ısı,ışık ile topraktaki besin maddeleri önemli faktörlerdir.

Doğal koşullarda yetiştirilen materyale ait mikrosporların embryoid verimi bakımından daha uygun oldukları saptanmıştır (SCHAEFFER ET AL.,1979).Ancak bu olgu tartışmalı olup,gerek tarlada gerekse sera şartlarında yetiştirilen anter donör bitkilerinin embryoid veriminde çok bariz bir fark gözlenmemiştir(DE BUYSER AND HENRY 1979;WONG AND CHEN 1980;BULLOCK ET AL.,1982).Farklı yıllarda yapılmış olan buğday anter kültürü çalışmalarından,kallus oluşumu ve yeşil bitki gelişimi frekansının farklı olduğu gözlenmiştir.Yetiştirme yeri ve koşulları aynı olsa bile farklı yıl ve mevsimler anter kültürünün başarısını farklı şekilde etkilemektedir(QUYANG ET AL.,1983).

Buğday anter donör bitkilerinin yetiştirildiği seralarda 15-20°C gece,20-25°C gündüz ısı rejimi yaygın şekilde kullanılmaktadır(FOROUGHİ ET AL.,1982;CHU AND HİLL 1988).Genotip ve genotip x çevre ilişkisi kallus oluşumu üzerine önemli olup,optimum çevre şartları genotiplere göre değişmektedir(JONES AND PETOLİNO 1987).

Anterlerin alındığı başakların donör bitki üzerindeki konumları bile embryoid verimi üzerine etkili olmaktadır;ZHANG VE ARKADAŞLARI(1987),birkaç buğday çeşidi ile yaptıkları anter kültürü çalışmalarında ana başağa ait polenlerin,yan başaklara ait polenlerden daha fazla sayıda embryoid verdiklerini rapor etmişlerdir. Ayrıca,ana sürgün üzerindeki başaktan alınan anterlerden oluşan yeşil bitkiciklerin oranı,albinolara göre çok fazladır(WANG AND CHEN 1980).

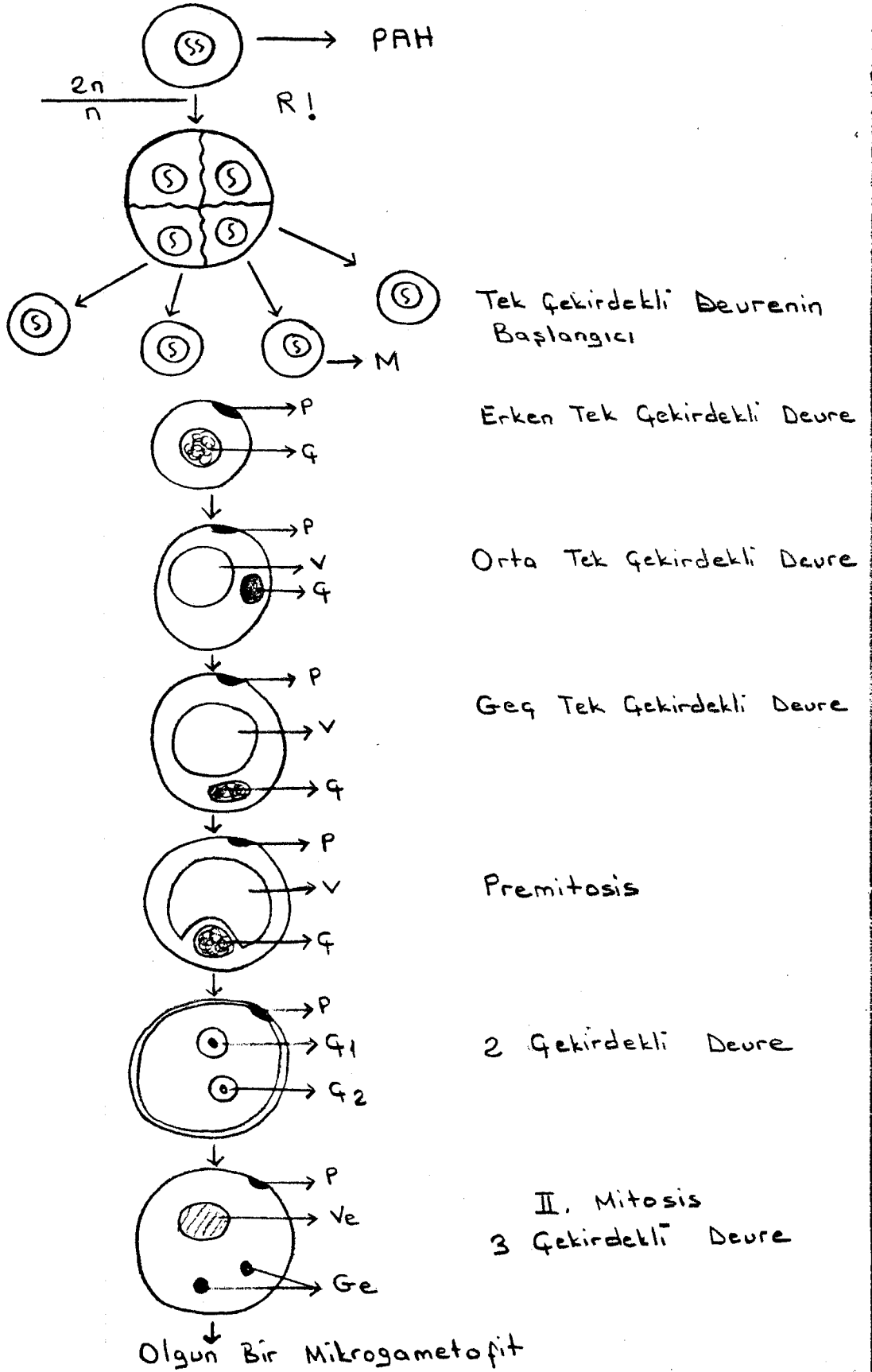
1.3. POLEN GELİŞME DEVRESİ

Besi ortamına ekimi yapılan anterlerin içindeki mikrosporların gelişme devreleri, bitkiciklerin oluşmasında önemli bir faktördür. Bu devreler; mikrospor içindeki çekirdeğin büyüklüğü, şekli, pozisyonu ve geniş bir vakuol'un varlığı veya yokluğu ile karakterize edilmektedir (Şekil 1). Şekil 1'de görüldüğü gibi, mikrosporun tek çekirdekli devresinin başlangıcında çekirdek mikrosporun ortasında küresel bir yapıda olup, hücrede çimlenme por'u ve vakuol yoktur. Erken tek çekirdekli devrede yine çekirdek mikrosporun ortasında ve küresel yapıdadır, çimlenme por'u oluşmuş, vakuol henüz ortaya çıkmamıştır. Orta tek çekirdekli devrede mikrospor biraz daha büyümüş, vakuol oluşmuş ve çekirdek mikrosporun membranına doğru hareket etmiştir. Geç tek çekirdekli devrede ise vakuol'un hacmi en üst seviyeye ulaşmış, çekirdek ise çimlenme por'unun tam karşısında yerini almıştır ve şekli ovaldir. Daha sonra tekrar küresel şekil alır, hacmi artarak vakuol'e baskı yapar ve onun membranını içeri göktürür, böylece mikrosporun premitosis devresi başlar.

Anter kültürünün başarısı, mikrospor gelişme devresinin değişimi ile çok yakından ilişkilidir. Optimum anter gelişme devresi tür ve çeşitlere göre değişmektedir (QUYANG ET AL., 1983). Buğdaygillerde inokulasyon için en uygun anterler "orta tek çekirdekli" yada "geç tek çekirdekli" gelişme devresindeki mikrospora sahip olanlardır (QUYANG ET AL., 1973; PAN AND KAO 1978; DING AND QUYANG 1984; HUANG 1986). "Orta veya geç tek çekirdekli devre"li mikrospora sahip anterler haricindekiler inokulasyon için kullanılırlarsa, embryoid verimi aniden düşer. Tütün, Datura gibi bazı diğer dikotiledon türlerde ise "iki çekirdekli" mikrospor devresi inokulasyon için daha uygun olmaktadır (HUANG 1986).

1.4. BAŞAKLARIN VERNALİZASYONU (ÖN UYGULAMA)

Anter donor bitkilerden hasat edilen başaklar, anterlerin inokulasyonundan önce 3-5°C de 48 saat süreyle soğuk bir ortamda bekletildiklerinde, embryoid veriminin arttığı bildirilmiştir (PAN ET AL., 1975). Bu olay aynı zamanda hasat edilen başakların 2-7 gün süreyle depolanabilmelerine de olanak sağlamaktadır (DE BUYSER AND HENRY 1979).



Şekil 1. Buğdaygillerde Mikrospor'un Gelişme Devreleri (PAH: Polen ana hücresi, R: Mayoz bölünme, M: Mikrospor, P: Por, Ç: Çekirdek, V: Vakuol, Ve: Vegetatif çekirdek, Ge: Generatif çekirdekler)

(He D G, QUYANG JW 1984'den değiştirilmiştir)

1.5. BESİ ORTAMLARININ BİLEŞİMLERİ

Başlangıç besi ortamlarının bileşimleri, bu konunun en can alıcı noktasıdır. Çeşitli araştırmacılar tarafından bu konu ile ilgili, yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Besi ortamlarının isimleri de çoğu kez bu ortamları geliştiren araştırmacıların isimleriyle anılmaktadır. Örneğin "MS besi ortamı" (MURASHIGE AND SKOOG 1962), "Miller besi ortamı" (MILLER 1963), "N₆ besi ortamı" (CHU 1978), "C1 besi ortamı" (WEI 1982), "Patates besi ortamı" (LAZAR ET AL., 1985; QUYANG 1986; SAGI AND BARNABAS 1989), buğday anter kültürü çalışmalarında yaygın şekilde kullanılmaktadır. Besi ortamlarının bileşimleri; organik ve inorganik bileşikler, özellikle B grubu olmak üzere vitaminler ve bitki büyüme maddelerinden oluşmaktadır. Besi ortamının ana bileşiklerinden olan şeker, hem karbon kaynağı hem de ozmotik basınç düzenleyicisi olarak iş görmektedir. Besi ortamı içindeki optimum şeker konsantrasyonunun %7-10 olduğu rapor edilmiştir (QUYANG ET AL., 1973; PAN ET AL., 1975; CHU AND HILL 1988). AgNO₃ ise etilen oluşumunu önlemekte, hücre bölünmesini ise teşvik etmektedir. Buğdayda 5-10 mg/l AgNO₃ konsantrasyonu, kallus kültürlerinde sürün oluşumunu hızlandırmaktadır (PURNHAUSER ET AL., 1987).

Bitki hormonları olarak oksinler (2,4-D: 2,4 dichlorophenoxyacetic asit, NAA: Naftalen asetik asit, IAA: İndol asetik asit), sitokininler (kinetin, zeatin, 6 benzilaminopurin) yaygın şekilde kullanılmaktadırlar. Bir hormonun diğerlerine göre önceliği, farklı kombinasyonları, konsantrasyonları anter kültürünün sonucunu etkilemektedir. 2,4-D, polenlerden embryoidlerin oluşumunu teşvik etmektedir. Anterlerin inokülasyonundan sonra ilk 12 gün içinde besi ortamında 2,4-D bulunmadığı takdirde embryogenesis oluşmamaktadır (HENRY AND DE BUYSER 1981). Ancak hücre yağınlarının oluşumu için gerekli olan bu madde, daha sonraki aşamada embryoid'lerden bitkiciklerin farklılaşabilmesi için ortamdaki uzaklaştırılması gerekmektedir (MARSOLAIS AND KASHA 1985; LIANG ET AL., 1987). İyi bir besi ortamı, hormonlar, amino asit ve organik tuzların kombinasyonundan oluşmaktadır. Serine, Proline, arginin aspartik asit, alanin, glutamin (CHU AND HILL 1988) ve myo-inositol (ZHANG ET AL., 1987) ile desteklenen besi ortamları embryoid oluşumunu, embryoid büyüklüğünü, bitki farklılaşması ile yeşil bitki gelişimini artırmaktadır.

Embryoidlerin farklılaşması ile bitkiciklerin oluşumu,embryo-id'in farklılaşma yeteneğine bağlı bir olgudur.Embryoidlerden farklılaşma ile bitkiciklerin elde edilmeleri için hazırlanan"Regenerasyon Besi Ortamı"nın seçimi,"Başlangıç Besi Ortamı" kadar hassas değildir.Bu iki besi ortamı arasındaki en önemli fark,oksin ve şeker konsantrasyonu ile ilgilidir.Regenerasyon besi ortamındaki oksin ve şeker konsantrasyonu diğerine nazaran daha düşük tutulmaktadır.Şeker konsantrasyonunun % 3 gibi bir oranda bulunması gerektiği,aksi halde regenerasyon oranının düştüğü bildirilmiştir(ZHUANG AND XU 1983,HU 1986).Regenerasyon besi ortamında kullanılan oksinlerin de (NAA,IAA) konsantrasyonlarının düşük olması gerektiği rapor edilmiştir.

Embryoidlerin farklılaşması sonucu oluşan bitkiciklerin geliştirildiği "Bitki Geliştirme Besi Ortamı"nın bileşiminin de hemen hemen "Regenerasyon Besi Ortamı" ile aynı olduğu,sadece oksin ve sitokinin konsantrasyonlarının daha düşük tutulması yada hiç kullanılmaması gerektiği bildirilmiştir.

1.5.1. Besi Ortamlarının Fiziksel Özellikleri

Yapılan çok sayıda literatür incelemesine göre besi ortamlarının sıvı,yarı-katı yada katı olduğu görülmüştür.Bu ortamlar genellikle agar ile katılaştırılmaktadır.Ancak besi ortamı,agar yerine agarose ile katılaştırıldığında daha iyi sonuçlar alındığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır.Bu çalışmalardan birinde agarın gelişmeyi engelleyici bir madde içerdiği bildirilmiştir(LYNE ET AL., 1984).Buğday anter kültürü çalışmalarında sıvı besi ortamı,takı besi ortamına göre daha fazla tercih edilmektedir(CHU AND HILL 1988;HENRY AND DE BUYSER 1981;LAZAR ET AL.,1985).Besi ortamının fiziksel yapısıyla ilgili araştırmalarda sıvı besi ortamının,agar ile katılaştırılmış besi ortamına göre kallus oluşturması bakımından daha iyi,fakat katı besi ortamının da bitkicik farklılaşması oranı bakımından sıvı besi ortamına göre daha iyi olduğu gözlenmiştir(WEI 1982;LAZAR ET AL.,1985;ZHOU AND KONZAK 1989).Sıvı besi ortamının katı besi ortamına göre daha iyi olmasının nedeni,anter kültürü sırasında bitki dokusundan bırakılan kültürü olumsuz şekilde etkileyecek maddelerin hızlı dağılımını ve mikrosporların besin maddelerine ve hormonlara daha iyi yaklaşımlarının sağlanmasındandır(LAZAR ET AL.,1985;ZHOU AND KONZAK,1989).Katı haldeki "Regenerasyon Besi Ortamı" ile sıvı

yapıdaki arasında önemli bir farkın bulunmadığı, yalnız sıvı regenerasyon besi ortamının katıya oranla daha sağlıklı köklenme ve gelişme sağladığı rapor edilmiştir.

1.6. ANTER KÜLTÜRÜNÜN ORTAM ŞARTLARI

Anter donör bitkilerinin yetiştirildiği çevre şartları olduğu gibi kültür periyodu sırasında da başarıyı etkileyen çevre şartları bulunmakta olup, bunlar özellikle ısı, ışık, kültürün bekleme süresi ve oksijen olarak bildirilmiştir.

Anter kültürü çalışmalarında, anterlerin inokülasyonundan sonra embryoidlerin oluşum periyoduna kadar ışığa gereksinim olmadığı gösterilmiştir (QUYANG 1986). Embryoidlerin "Regenerasyon Besi Ortamına" alınmalarından sonraki gelişme periyodunda ise, klorofil oluşumu için ışığa gereksinim duyulmaktadır.

Anterlerin inokülasyonundan sonraki ısının, özellikle embryoid oluşum devresinde çok önemli olduğu, sadece 2-3°C lik ısı farklılıklarının bile embryoid veriminde önemli derecede dalgalanmalara neden olduğu bildirilmiştir (Lİ 1978). Kültür ortamı ısı, 17°C den 30°C ye yükseldikçe embryoidlerden bitkiciklerin regenerasyonu oranında bir artış olmasına rağmen, yüksek sıcaklıkta yeşil bitkilerin albinolara oranı düşmektedir (QUYANG 1986). Çeşitli araştırmalar sonucunda, kültür ortamı optimum ısısının 25-27°C arasında olmasına rağmen, bu ısının genotipe bağlı olarak değişebildiği de saptanmıştır (QUYANG ET AL., 1983).

Başlangıç besi ortamında kültürün bekleme süresi de bitki regenerasyonunu etkilemektedir (QUYANG ET AL., 1983). Embryoidlerden bitkiciklerin regenerasyonu kabiliyeti, ilk oluşan embryoidlerde daha sonra oluşanlara göre daha yüksektir.

Anter kültürünü etkileyen diğer bir faktör de oksijen olup, içlerine besi ortamı konulan petri, tüp veya kavanozların besi ortamı dışında kalan kısımlarındaki hava boşluğunun, yüksek oranda gaz değişimi sağlaması nedeniyle embryoid gelişimini teşvik ettiği belirtilmiştir.

Besi ortamlarının PH'sı da başarılı bir çalışma için önemlidir. Birçok besi ortamı için kullanılan PH değerleri 5.2 ile 6.2 arasında olmaktadır (PIERIC 1987a; ZHOU AND KONZAK 1989).

1.7.ALBİNİZM

Buğdaygiller üzerinde yapılan anter kültürü çalışmalarında sağlıklı bitkilerin elde edilmelerini etkileyen önemli faktörlerden biri de albinizm'dir. Bir klorofil kusuru olan albinizm'in mekanizması oldukça karışık olup, genetik ve fizyolojik faktörlerle ortaya çıkmaktadır (ANDERSEN ET AL., 1987). Doku kültürü çalışmalarında albino bitkilerin oluşumu arzu edilen bir durum olmayıp, bunların meydana gelmesini engelleyen faktörlerin; uygun devredeki mikrosporlara sahip anterlerin seçimi, besi ortamının bileşimi, kültür ortamının çevre şartları ve anter donör bitkilerin genotipi olduğu belirtilmiştir (QUYANG ET AL., 1983; HU 1986; LIANG ET AL., 1987).

Kültür ortamı ısısının, albino bitkilerin meydana gelmesi üzerinde etkili olduğu görülmüştür. 25-27°C lik kültür ortamı ısısında albino bitkilerin oluşum oranı yeşil bitkilere göre az, 21-22°C de ise daha fazladır (SIMONDS 1989). Ancak bazı araştırmacılar tarafından albino bitkilerin oluşum oranının, kültür ortamı ısısı ile değişmediği gösterilmiştir (PICARD AND DE BUYSER 1975).

Albinizm oranı, anterlerin donör bitkilerden alınması esnasında mikrosporlar içindeki proplastidlerin metamorfizm derecesine bağlı olarak değişmektedir. Gametofitik devrede proplastidlerin kloroplastları geliştirme yeteneklerini kaybettikleri bildirilmiştir (HUANG 1986). Besi ortamına inokülasyonu yapılan anterlerin mikrosporlarındaki proplastidlerin metamorfizmi gerçekleşmiş ise bunlardan gelişen bitkiciklerin albino olduğu belirtilmiştir. Buğdaygil mikrosporlarında proplastidlerin metamorfizmi orta veya geç tek çekirdekli devrede tamamlanmaktadır. Bu nedenle Triticum aestivum ve Hordeum vulgare'nin gelişmiş devredeki mikrosporları, anter kültürü için kullanıldığında, albino bitkilerin oluşum oranı artmaktadır. İki çekirdekli yada daha yaşlı mikrosporlar kullanıldığında ise, oluşan bitkilerin tümü albino olmaktadır. Halbuki, Nicotiana tabacum, Datura stramonium ve diğer bazı dikotiledon bitkilerinde tahıllara göre anter kültürü için, daha geç devredeki mikrosporlar kullanılmaktadır. Bu bitkilerde proplastidlerin metamorfizmi, mikrosporun "geç iki çekirdekli devre" sine kadar gerçekleşmemektedir. Bu nedenle albino bitki oluşumu da seyrek olur.

Geniş literatür bilgisine dayalı olarak, çok çeşitli alanlarda uygulamaları olan doku kültürü tekniklerine karşı duyulan ilgi, yurdumuzda son yıllarda artmıştır. Ancak gelişmiş ülkelerde bitki ıslahı ve üretimi gibi tarım alanlarında yaygın olarak kullanılan bu teknikler yurdumuzda henüz yenidir. İşte bu gerçekten hareket ederek ileride yapılacak araştırmalara yol göstermesi amacıyla, bu çalışma yapılmıştır. Çalışmamızda; kışlık ekmeçlik buğday (T.aestivum) çeşitleri kullanılarak, anter kültürünün başarısına sınırlandıran faktörlerden genotip, besi ortamı ve anter donör bitkilerinin yetiştirildikleri çevre ısısı etkilerinin ortaya konulması, amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE METODLAR

2.1. MATERYAL

Bu çalışmada, bir kültür bitkisi olan T.aestivum (Buğday)'un 6 kültür çeşidi kullanılmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. Çalışmada Kullanılan Buğday Çeşitleri (b: 1B/1R Translokasyonlu Varyeteler, Orijinleri: USA, a: 1B/1R Translokasyonlu Varyete, Orijini: USSR).

Sıra No:	Kod No:	Kültür Çeşitleri
1	Bw.2	Seri 82 ^a //Veery ^a /Sunbird
2	Bw.5	Sunbird//Clement ^a /Alondra ^b
3	Bw.8	Cham-4/76529 A5-3
4	Bw.9	EGVD-14/Roshan
5	Bw.15	Hodhad ^a /Sudan ^a
6	Bw.17	Pavon 76(varyete)

Araştırma materyalleri, diğer bir ifade ile kışlık ekmeçlik buğday çeşitleri ^xICARDA ve ^{xx}CIMMYT'in ıslah programlarından alınmıştır.

^xICARDA; International Center For Agricultural Research in Dry Areas, Halep/SURİYE

^{xx}CIMMYT; International Maize and Wheat Improvement Center, Meksiko city
MEKSİKA

2.2. METODLAR

2.2.1. Donor Bitkilerin Elde Edilmesi

Araştırmada kullanılan anterlerin alındığı donör bitki tohumları, önce petri kutularında çimlendirilmişlerdir. Tohumlar çimlenir çimlenmez içinde 1:1:1 oranında toprak, çiftlik gübresi ve kum karışımı bulunan saksılara şaşırtılarak, uygun sera koşullarında yetiştirilmişlerdir (Resim 1).

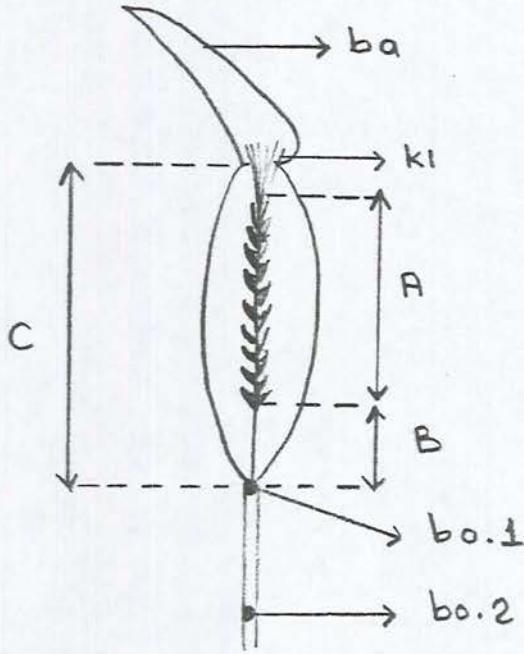


Resim 1. Sera Şartlarında Donor Bitkilerin Yetiştirilmesi

Burada bitkiler 2-3 kardeşli hale geldiklerinde, 2 hafta süre ile vernalizasyona tabi tutulmuşlardır. Vernalizasyon işleminden sonra bitkiler iki gruba ayrılmışlar ve bunlardan 1. grup gündüz 18°C-gece 12°C, 2. grup ise 23°C gündüz-17°C gece ısısına tabi tutulmuşlardır. Her iki durumda da uygulanan fotoperiyod 16 saat ışık ve 8 saat karanlıktır. Fotoperiyod uygulamasında güneş ışığına ek olarak 5000 lük floresans lambalarından yararlanılmıştır. Tohumların ekiminden başakların hasat edilmesine kadar olan yetiştirme periyodu, yaklaşık 8 hafta sürmüştür.

2.2.2. Başakların Hasat Edilmeleri

Bitkiler hergün kontrol edilerek, uygun devrede olan başaklar sabah saatlerinde hasat edilmişlerdir. Hasat esnasında Şekil 2'de görüldüğü gibi, başağın bayrak yaprağının tabanı ile onun uzantısı olan ve başağı saran kının çıktığı birinci boğum(Şekil 2,bo.1) arasındaki uzunluk(Şekil 2,C) ve başakların kalınlığı göz önünde bulundurulmuştur. Ayrıca mikrosporların gelişimi hakkında bilgi veren morfolojik diğer bir kriter de, başağın ligula bölgesindeki kından dışarı çıkan aristalar (kılçıklar) olmuştur(Şekil 2). Anter kültürü için uygun olan başaklar 2.boğumdan (Şekil 2,bo.2) kesilerek içinde su bulunan bir kavanoza konulmuşlardır.



Şekil 2. Uygun Devredeki Bir Başak (A: Başağın Verimli Kısmı
B: Pedisel, C: Kın Uzunluğu, bo.1: Birinci Boğum, bo.2: İkinci
Boğum, K1: Arista(kılçıklar), ba: Bayrak Yaprak).

2.2.3. Ön Uygulama

Hasat edilip içinde su bulunan kavanozlara yerleştirilen başaklar, inokulasyondan önce $+4^{\circ}\text{C}$ de karanlıkta 2-7 gün süreyle muhafaza edilerek ön işleme tabi tutulmuşlardır (Resim 2).



Resim 2. Ön İşlem İçin Hazırlanmış Başaklar

2.2.4. Besi Ortamlarının Hazırlanması

Anterlerin inokulasyonundan, bitkiciklerin elde edilmesine kadar "Başlangıç Besi Ortamı", "Regenerasyon Besi Ortamı", "Bitki Geliştirme Besi Ortamı" olmak üzere 3 farklı besiy ortamı kullanılmaktadır. Her birinin hazırlanış yöntemi aynıdır. Besiy ortamlarının hazırlanması sırasında; Fe EDTA, AgNO_3 , Sucrose ve agarose gibi ısıya dayanıklı kimyasal maddelerin karışımından oluşan çözelti, 128°C ısı ve 1 Atm. basınca ayarlanmış otoklavda sterilize edilmiştir. Besiy ortamlarının bileşimlerinde yer alacak olan ısıya dayanıksız diğer kimyasal maddeler de 0.45 ml'lik por'lara sahip filtre kağıdından süzülerek sterilize edilmişlerdir. Farklı sterilizasyon işlemine tabi tutulan bu kimyasal çözeltiler daha sonra birbiriyle karıştırılarak steril koşullarda petrilere boşaltılmışlardır.

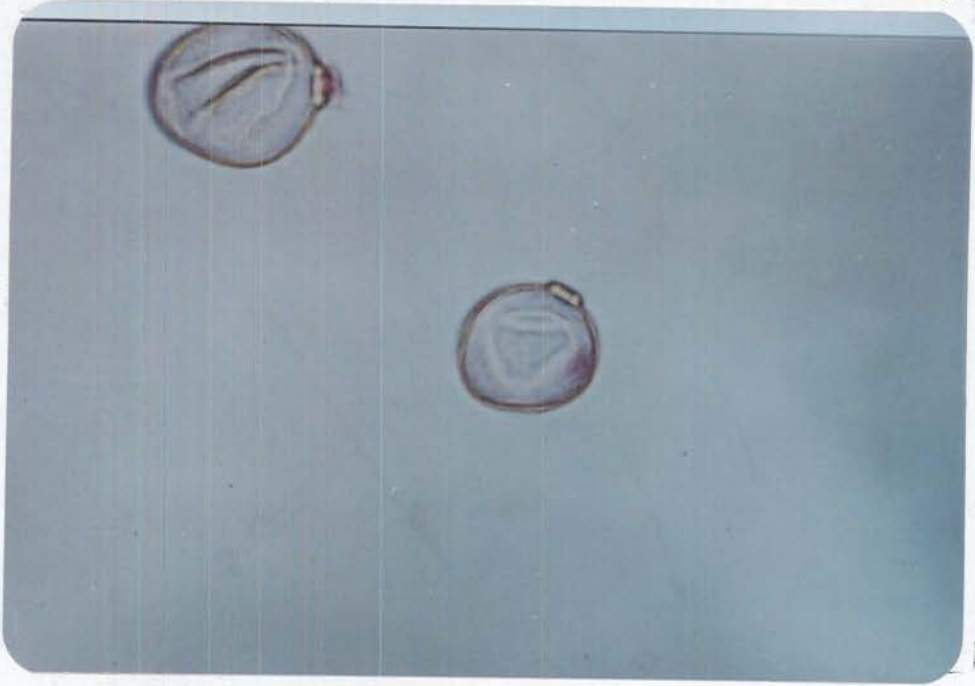
2.2.5. Anterlerin İnokülasyonu

Soğuk uygulamasından sonra başaklar,yaprak kınlarından ayrılarak,anterlerinin inokülasyon için uygun devrede olup olmadıkları kontrol edilmiştir(Resim 3). Bu amaçla başağın orta bölgesinde bulunan bir spikula (başakçık)'ya ait olan anterlerin,üzerinde 1 damla % 1-2 asetokarmin bulunan lam üzerine konularak,ezme preparat yöntemiyle preparatları hazırlanmış ve binoküler altında incelenmişlerdir.



Resim 3. Başakların İnokülasyon İşlemi İçin Hazırlanması

Uygun devredeki mikrosporlara (Resim 4) sahip olan başaklar korunarak,diğerleri atılmışlardır.Uygun devredeki başaklar,%1.3 Na hipoklorit (çamaşır suyu) solusyonunda 3 dakika süreyle bekletilerek sterilize edilmişlerdir.Daha sonra,steril koşullarda bidestile suyun içinden 2 kez geçirilmişlerdir.



Resim 4. Uygun Devredeki Mikrosporlar

Başlangıç besi ortamları I, II, III, IV, olmak üzere farklı bileşimlerde hazırlanmışlardır. Ancak bunlardan I, II, III no'lu besi ortamları, anterlerin inokülasyonu işleminde kullanılmışlardır (Tablo 2, Resim 5, Resim 6). Bir başağa ait anterler, içinde yaklaşık 15 ml başlangıç besi ortamı bulunan uygun büyüklükteki (9-12cm) petri kaplarına inoküle edilmişlerdir (Resim 7, Resim 8). İnokülasyondan 10 gün sonra, anterlere zarar verilmeden II (yarı-katı) ve III (sıvı) no'lu besi ortamları ayarlanabilir bir pipet yardımıyla petrilerden alınarak yerlerine, içinde IAA (indol asetik asit) bulunan ve 2,4-diklorofenoksi asetik asit) konsantrasyonu düşük olan IV (yarı katı) no'lu başlangıç besi ortamı konulmuştur. Ancak, katı olan I no'lu başlangıç besi ortamı değiştirilmemiş aynen bırakılmıştır.

Tablo 2. Başlangıç Besi Ortamları (Murashige ve Skoog 1962'den değiştirilmiştir) (* sonuçları etkilediği düşünülen değerler)

Kimyasal maddeler mg/l	I (katı)	II (yarı katı)	III (sıvı)	IV (yarı sıvı)
<u>Makro Elementler</u>				
KNO ₃	1900	1900	1900	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	440	440	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	370	370	370
KH ₂ PO ₄	170	170	170	170
NH ₄ NO ₃	165	165	165	165
Fe EDTA	65,1	65,1	65,1	65,1
<u>Mikro Elementler</u>				
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	22,3	22,3	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	8,6	8,6	8,6
H ₃ BO ₃	6,2	6,2	6,2	6,2
KI	0,83	0,83	0,83	0,83
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,025
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,25	0,25	0,25
AgNO ₃	10	10	10	10
<u>Vitaminler</u>				
Biotine	0,4	0,4	0,4	0,4
Ascorbic acid	0,4	0,4	0,4	0,4
Nicotinic acid	0,4	0,4	0,4	0,4
Pyridoxine	0,4	0,4	0,4	0,4
Thiamine HCl	0,4	0,4	0,4	0,4
<u>Organik Elementler</u>				
Glutamine	750	750	750	750
Myo-inositol	100	100	100	100
Agarose	6000 *	2000 *	-	2000
Sucrose	85500	85500	85500	85500
2,4-D	1 *	2 *	4 *	0,5 *
IAA	-	-	-	2 *
pH	5,8	5,8	5,8	5,8



Resim 5. Laminar Akımlı Steril Çalışma Kabini ve İçerisinde Besi Ortamları Bulunan Kaplar

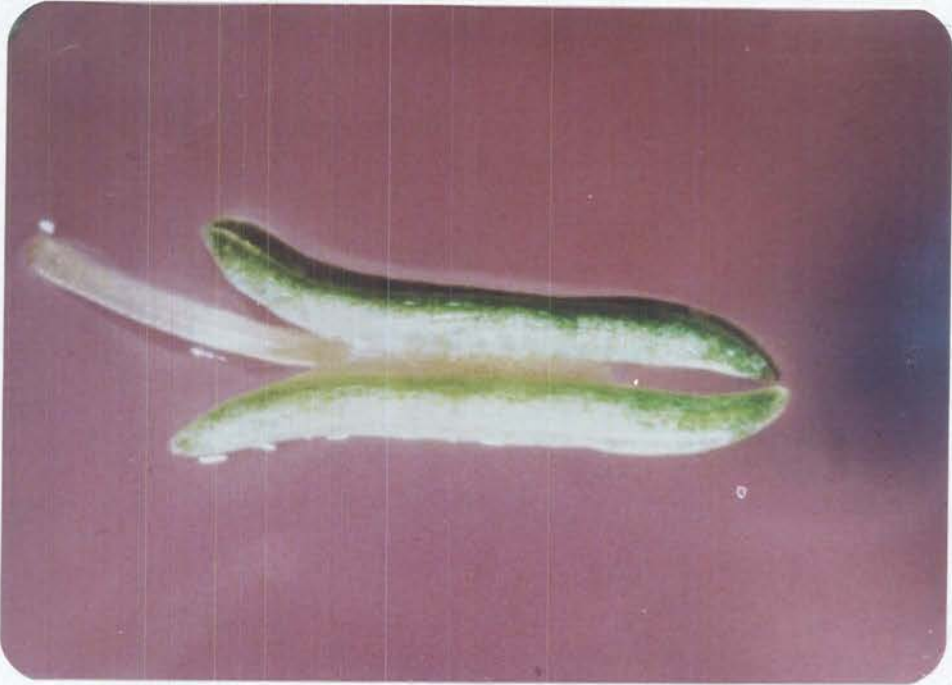


Resim 6. Laminar Akımlı Steril Kabin İçinde, Başaklardan Anterlerin Temini

İnokülasyon esnasında dişi organların besi ortamına konulmamasına dikkat edilmiştir. İnokülasyon işlemi tamamlanmış olan petri kapları, kontaminasyonu önlemek amacıyla, steril kabin içinde plastik bantlarla kapatılmışlardır.



Resim 7. İnoküle Edilmiş Anterler



Resim 8. İnoküle Edilmiş Anterin Yakından Görünüşü

İnokülasyon işlemi tamamlanan kültürler, $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ de karanlık koşullarda inkübasyona tabi tutulmuşlardır (Resim 9). İnokülasyondan 4 hafta sonra ise, kültür kaplarında gözle bile rahatlıkla görülebilen hücre yığınları oluşmuştur (Resim 10).



Resim 9. İnkübasyona Tabi Tutulan Kültürler

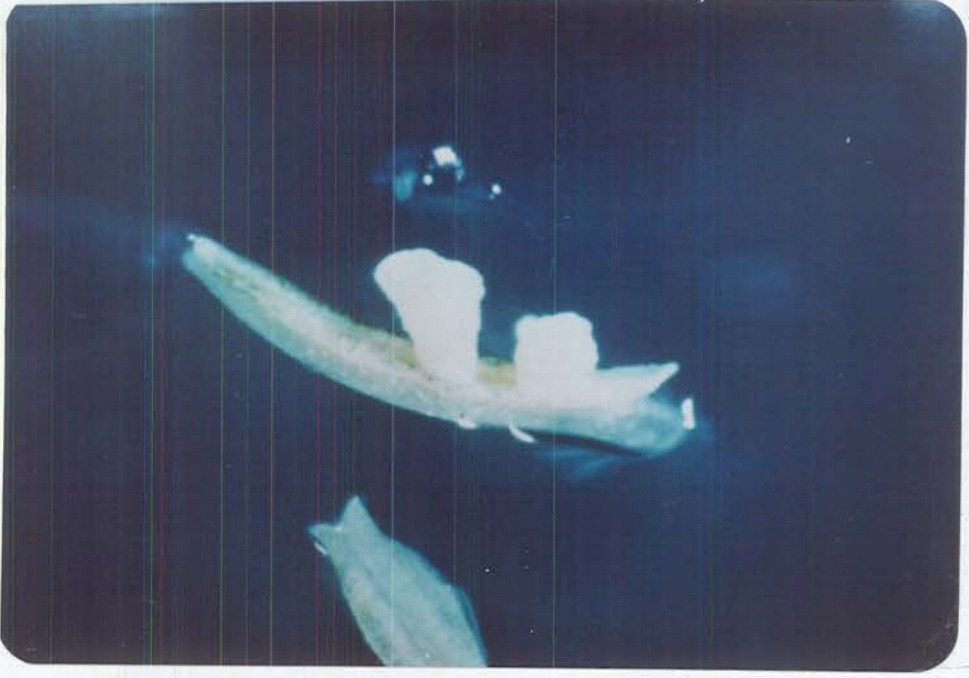


Resim 10. Anterlerin Üzerinde Hücre Yığınlarının Oluşumu

Kültür kapları her hafta kontrol edilerek, 1-2 mm lik büyüklüğe erişen hücre yığınları, regenerasyon besi ortamına yine steril kabin içerisinde alınmışlardır (Resim 11).

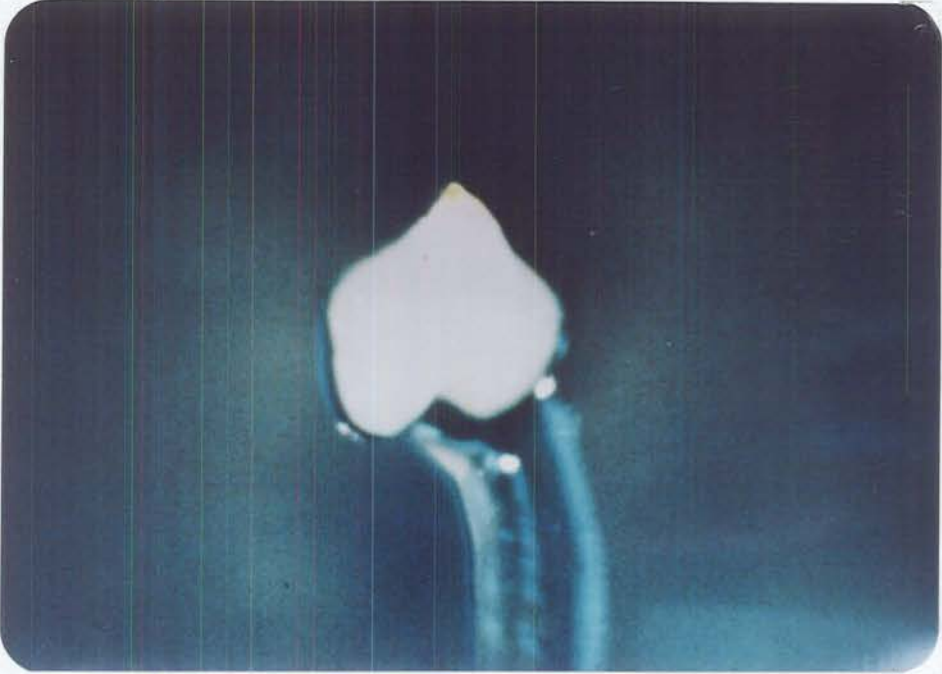
Tablo 3. Regenerasyon Besi Ortamı

Makro Elementler	mg/l
KNO ₃	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
NH ₄ NO ₃	165
Fe EDTA	65,1
Mikro Elementler	
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
H ₃ BO ₃	6,2
KI	0,83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,02
AgNO ₃	5
Vitaminler	
Biotine	0,4
Ascorbic acid	0,4
Nicotinic acid	0,4
Pyridoxine acid	0,4
Thiamine HCl	0,4
Organik Elementler	
Glutamine	750
Myo-Inotisol	100
Casein hydrolisat	250
Agarose	6000
Sucrose	34200
IAA	2
Adjusted pH (Ayarlanmış)	5,8



Resim 11. Regenerasyon Besi Ortamına Aktarılacak Hale Gelmiş Embryoidlerin Görünüşü

Hücre yığınlarının transfer edildiği ve içlerinde "Regenerasyon Besi Ortamı" bulunan kültür kapları, $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ de karanlıkta 5 gün süreyle inkübatörde bekletilmişlerdir (Tablo 3, Resim 12).



Resim 12. Regenerasyon Besi Ortamına Aktarılmış Bir Embryoidin Görünüşü

Daha sonra embryoidler, kültür ortamı ısısı aynı olmak suretiyle 5000 lux'lük bir ışık ve 16 saat lik fotoperiyoda maruz bırakılmışlardır. Yaklaşık 3-4 hafta süre ile embryoidlerden bitkicikler oluşuncaya dek, kültür kapları burada bırakılmışlardır (Resim 13).



Resim 13. Embryoid'den Regenere Olan Bitkicik Taslakları



Resim 14. "Bitki Geliştirme Besi Ortamı"na Aktarılmaya Uygun Bitkicik

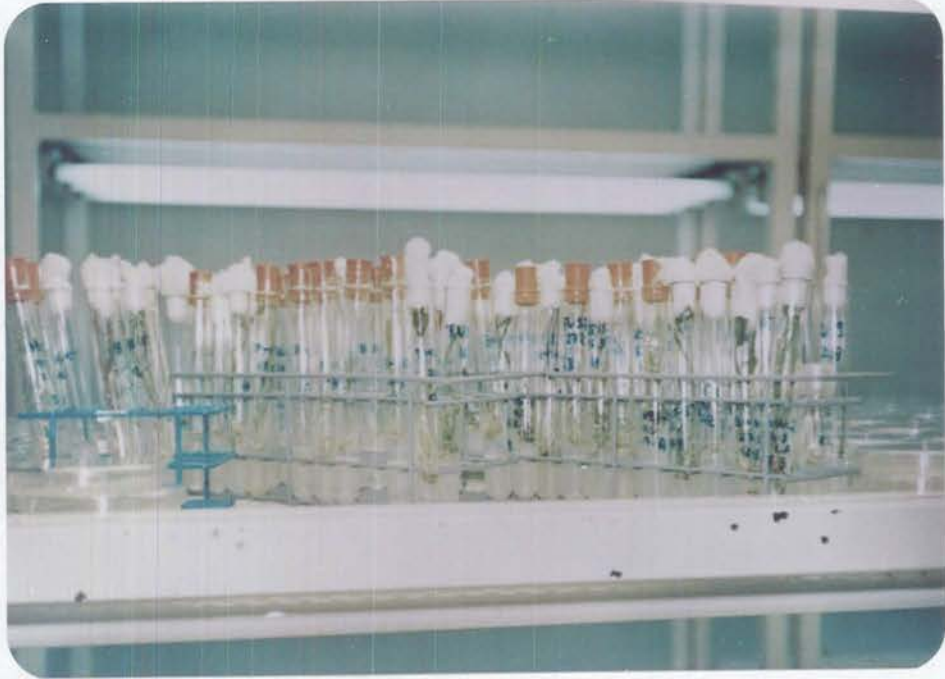
Tablo 4. Bitki Geliştirme Besi Ortamı

<u>Macro Elementler</u>	<u>mg/l</u>
KNO ₃	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
NH ₄ NO ₃	165
Fe EDTA	65,1
<u>Micro Elementler</u>	
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
H ₃ BO ₃	6,2
KI	0,25
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,83
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
<u>Vitaminler</u>	
Biotine	0,4
Ascorbic acid	0,4
Nicotinic acid	0,4
Pyridoxine acid	0,4
Thiamine HCl	0,4
<u>Organik Elementler</u>	
Glutamine	750
Myo-inositol	100
Sucrose	20000
Agar	6000
IAA	0,5
Adjusted pH	5,8

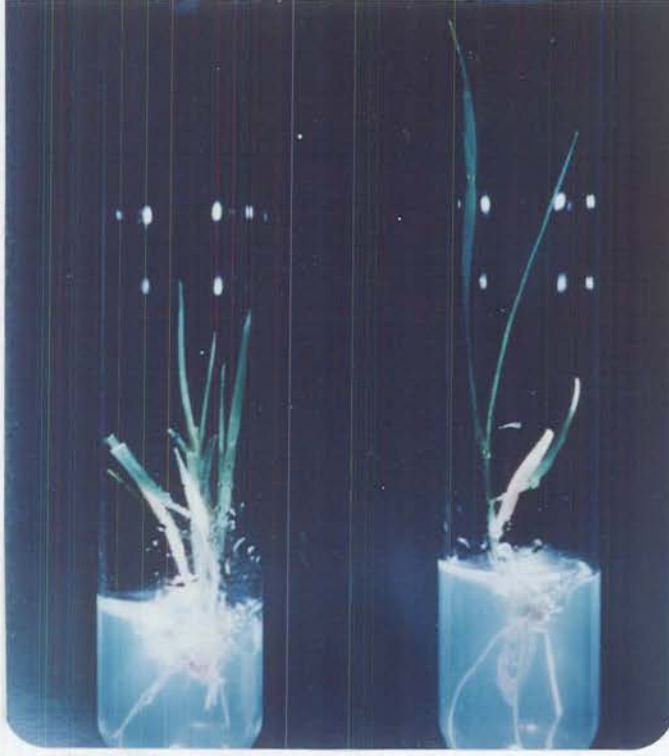
Yeşil bitkicikler oluşmaya başladıktan sonra kültür kapları steril kabin içine alınarak, bitkiciklerin daha iyi gelişebilmeleri amacıyla içlerinde "Bitki Geliştirme Besi Ortamı" bulunan tüplere şaşırtılmışlardır (Tablo 4, Resim 14).

2.2.6. Bitkilerin Saksılara Şaşırtılması

Bitkiler toprağa dikilebilecek büyüklüğe eriştiklerinde "Bitki Geliştirme Ortamı" ndan alınmışlardır (Resim 15, Resim 16). Verimsiz kısımları temizlenip, gerekli budamalar yapılmış ve içlerinde 1:1:1 oranında toprak, kum, yanmış ahır gübresi karışımı bulunan küçük saksılara şaşırtılmışlardır.



Resim 15. Kültür Geliştirme Odasında Gelişmelerini Sürdüren Bir Grup Bitkiden Görünüş



Resim 16. Toprağa Şaşırtılacak Büyüklüğe Erişmiş Bitkilerden İkisi

Bitkiler, sera şartlarına alıştırmak amacıyla 1 hafta süreyle, saksıların üzeri ince bir plastik ile örtülerek, laboratuvarında bekletilmişlerdir. Daha sonra sera şartlarına alıştırmışlardır (Resim 17).



Resim 17. Sera Şartlarına Alınan Saksılanmış Bitkiler

2.2.7. Kolşisin Uygulaması

Anterlerden oluşan bitkiler çoğunlukla monoploid'dirler. Bu nedenle de sterildirler. Bitkilerin verimli hale getirilebilmeleri, diğer bir deyişle diploid hale getirilebilmeleri için, kolşisin uygulaması yapılmıştır. Bitkiler 3-4 yapraklı hale geldiklerinde bu-
lundukları saksılardan çıkarıldılar, kökleri topraklarından arın-
dırılarak uçtan itibaren 3-4 cm lik kısımları kesildi. Bitkiler bu
haliyle içinde % 0.1 lik kolşisin* eriyiği bulunan bir kap içine
kök ve gövdeleriyle birlikte daldırılarak 22°C ısıda 4 saat tutul-
dular. Daha sonra, su ile yıkanarak yeniden saksılara dikildiler.

2.2.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Elde edilen verilerin değerlendirilmesinde aşağıdaki formül-
lerden yararlanılmıştır.

$$\% E = \frac{E}{A} \times 100$$

$$\% Eb = \frac{Eb}{E} \times 100$$

$$\% Yb = \frac{Yb}{A} \times 100$$

*%0.1 kolşisin eriği hazırlamak için; 1 gr.kolşisin içinde 20 ml t
DMSO(Dimethyle sulfoxide) ve 0.3 ml t Tween 20 bulunan 1 lt saf suda
çözündürülmüştür.

E= Embryoid sayısı

A= İnoküle edilen anterlerin toplam sayısı

100= Sabite

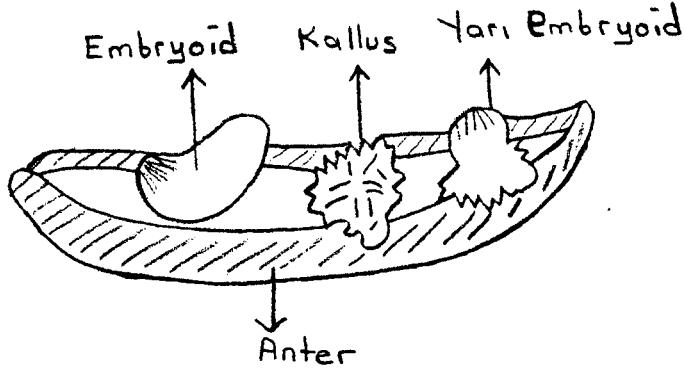
Eb= Bitkicik oluşturan embryoidlerin sayısı

Yb= Yeşil bitki sayısı

3. BULGULAR

3.1. ANTERLERDEN OLUŞAN HÜCRE YIĞINLARI

Başlangıç besi ortamına inoküle edilen anterlerin üzerinde oluşan hücre yığınlarının mikroskopik incelenmesi sonucunda; embryoid, yarı embryoid ve kallus tipinde oluşumlar oldukları saptanmıştır (Şekil 3).



Şekil 3. Üzerinde Hücre Yığınları Oluşmuş Bir Anterin Görünüşü

Bunlardan embryoid'lerin pürüzsüz, düzgün şekilli ve genellikle küresel yapıya sahip olup, koleoptil oluşturdıkları görülmüştür (Resim 12). Kallusların pürüzlü yüzeye sahip oldukları ve gevşek hücre yığınlarından oluştukları, yarı-embryoid'lerin ise kallus ile embryoid görünümü arasında oldukları da ayrıca saptanmıştır (Şekil 3).

3.2. BUĞDAYDA ANTER KÜLTÜRÜ ÜZERİNE GENOTİPİN ETKİSİ

Katı besi ortamı (başlangıç besi ortamı) üzerine inoküle edilen 6 farklı genotip'deki buğday çeşitlerine ait anterlerden embryoid ve bitkicikler elde edilmiş ve çeşitler embryoid ve bitki verimi bakımından karşılaştırılmışlardır (Tablo 5). Tablo 5'de görüldüğü gibi, 3 ve 4 no'lu buğday çeşitlerinin embryoid verimlerinin diğerlerine oranla çok düşük olduğu ve bitki oluşumu da göstermedikleri saptanmıştır, 2 ve 6 no'lu buğday çeşitlerinin ise, embryoid ve bitkicik oluşturma bakımından diğerlerine oranla en yüksek frekansa sahip oldukları görülmüştür.

2 no'lu buğday çeşidi ise diğerleriyle kıyaslandığında en yüksek embryoid verimi gösterdiği halde, embryoidlerden bitki regenerasyonu ve yeşil bitki gelişimi oranı ise en düşük değerdendir.

3.3. DONOR BİTKİLERİN YETİŞTİRİLDİĞİ ÇEVRE İSİSİNİN EMBRYOİD OLUŞUMU VE BİTKİ GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİSİ

Donor bitkilerin yetiştirildiği ortam ısısının embryoid verimi ve yeşil bitki oluşumu üzerine etkilerini araştırmak amacıyla bitkiler, sıcaklığı ayarlanabilen seralarda yetiştirilmiştir. 1 ve 5 no'lu buğday çeşitleri a uygulamasında en yüksek embryoid verimini (%28.0, %24.5) ve yeşil bitki oluşumunu (%22.4, %11.9) göstermişlerdir (Tablo 6, Grafik 1). b uygulamasında ise 3 ve 4 no'lu buğday çeşitlerinin embryoid verimlerinin (%0.2, %2.0) çok düşük olduğu, bu nedenle de bitkicik oluşturmadaıkları saptanmıştır. 2 ve 6 no'lu buğday çeşitlerinin ise b uygulamasında daha fazla embryoid verimi (%13.4, %11.7) ve yeşil bitki oluşumu (%0.7, %3.3) gösterdikleri gözlenmiştir.

3.4. EMBRYOİD OLUŞUMU ÜZERİNE BESİ ORTAMININ ETKİSİ

2 buğday çeşidi ile yapılan karşılaştırmalı denemede besi ortamının, embryoid verimi ve bitkicik oluşumu üzerine etkileri incelenmiştir. Elde edilen verilere göre 6 no'lu buğday çeşidinin, 1 no'lu buğday çeşidine göre, katı besi ortamı üzerinde hem embryoid verimi (%11.7), hem de toplam bitkicik oluşumu (%4.6) bakımından daha üstün olduğu görülmüştür (Tablo 7). Bunun yanında aynı çeşidin, farklı fiziksel yapıdaki besi ortamları üzerindeki durumu incelendiğinde ise 6 no'lu çeşit, katı besi ortamında en yüksek embryoid verimine (%11.7) sahip olmasına rağmen, sıvı besi ortamında en yüksek bitkicik regenerasyonu göstermiştir. 1 no'lu buğday çeşidi de katı besi ortamında en yüksek (%10.1) sıvı besi ortamında en düşük (%7.0) embryoid verimi vermesine rağmen, sıvı besi ortamında en yüksek oranda (%4.4) yeşil bitki oluşumu sağladığı gözlenmiştir. 1 ve 6 no'lu genotiplerin her ikisinin de katı besi ortamı üzerinde, diğer besi ortamlarında olduğundan daha fazla albino bitkiler ürettikleri gözlenmiştir (Tablo 7).

Tablo 5. Buğday Çeşitlerinin Anter Kültüründeki Performansları

(Sera ısısı 23°C gündüz, 17°C gece, kullanılan besi ortamı I(katı))

SIRA NO	EMBRYO SAYISI	% EMBRYO SAYISI	% BİTKİ REGENERASYON FREKANSI	% BİTKİ OLUŞUMU		
				YEŞİL BİTKİ	ALBINO BİTKİ	TOPLAM
1	91 (890) *	10,1	41,1	3,4	0,5	4,2
2	81 (606)	13,4	13,6	0,7	1,1	1,8
3	1 (512)	0,2	-	-	-	-
4	8 (395)	2,0	-	-	-	-
5	115 (1063)	10,8	37,4	3,1	0,9	4,0
6	86 (734)	11,7	39,5	3,3	1,3	4,6

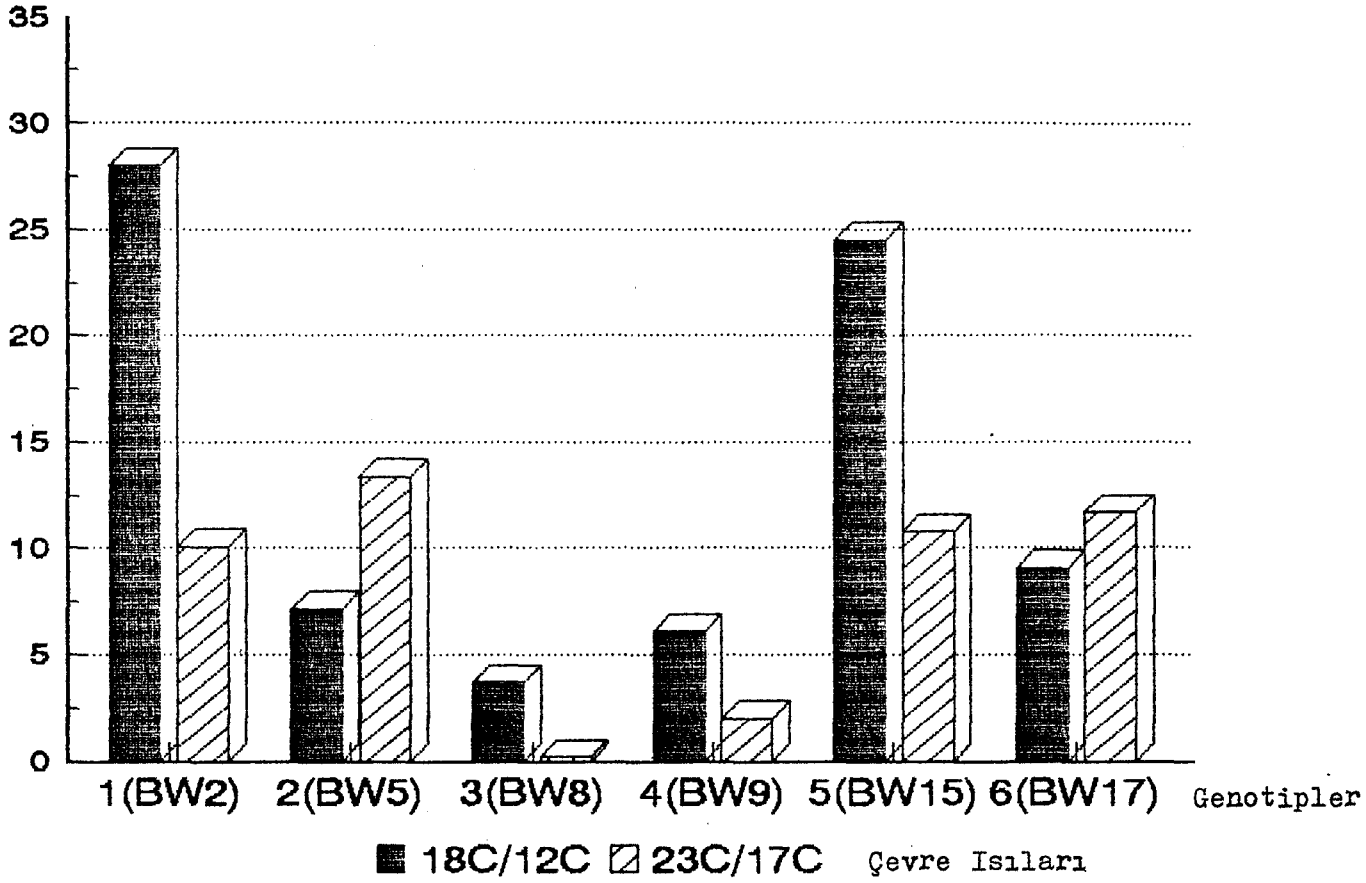
* İnokule edilen toplam anter sayısı.

Tablo 6. Embryoid ve Bitkilerin Oluşumu Üzerine Anter Donor Bitkilerin Yetiştirildikleri Çevre Isısının Etkisi

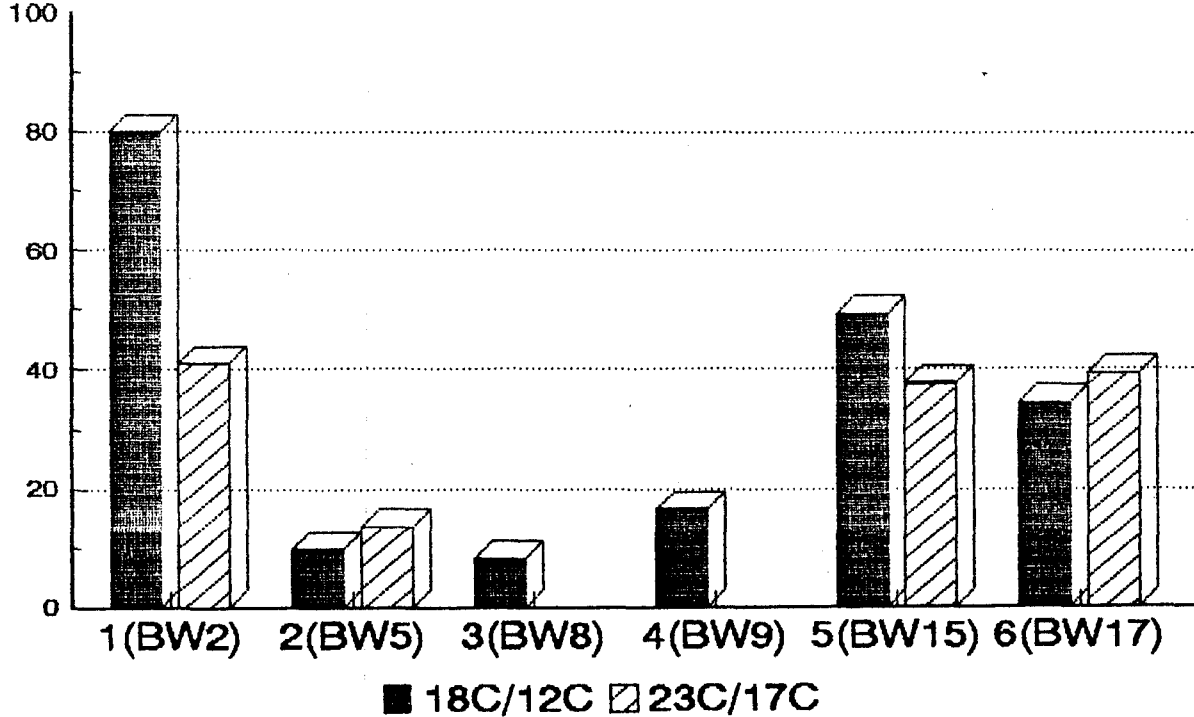
SIRA NO	UYGULAMA	ÇEVRE ISISI (gündüz/gece)	EMBRYOID SAYISI	EMBRYOID (%)	BITKİÇİK REGENERASYONU (%)	BITKİ OLUSUMU (%)		
						YEŞİL	ALBİNO	TOPLAM
1	a	18 C/12 C	80(286)*	28,0	80,0	22,4	0,0	22,4
	b	23 C/17 C	91(890)	10,1	41,1	3,4	0,8	4,2
2	a	18 C/12 C	32(446)	7,2	9,7	0,7	0,0	0,7
	b	23 C/17 C	81(606)	13,4	13,6	0,7	1,1	1,8
3	a	18 C/12 C	35(933)	3,7	8,1	0,3	0,0	0,3
	b	23 C/17 C	1(512)	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0
4	a	18 C/12 C	73(1203)	6,1	16,4	0,9	0,1	1,0
	b	23 C/17 C	8(395)	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0
5	a	18 C/12 C	141(576)	24,5	49,4	11,9	0,2	12,1
	b	23 C/17 C	115(1063)	10,8	37,7	3,1	0,9	4,0
6	a	18 C/12 C	64(706)	9,1	34,4	0,6	2,5	3,1
	b	23 C/17 C	86(734)	11,7	39,5	3,3	1,3	4,6

Grafik 1. Donor Bitkilerin Yetiştirildiği Çevre Isıları

% Embryoid Frekansl



% Bitki Regenerasyon Frekansl



Tablo 7. Buğday Anter Kültürü Üzerine Katı, Yarı Sıvı ve Sıvı Besi Ortamlarının Etkisi
(Sera ısısı 23°C gündüz, 17°C gece)

SIRA NO	BESİ ORTAMI	EMBRYOİD SAYISI	% EMBRYOID SAYISI	% BITKİKİK REGENERASYONU	% BİTKİ OLUŞUMU		
					YEŞİL	ALBİNO	TOPLAM
1	KATI	91 (890)	10,1	41,1	3,4	0,8	4,2
	YARI SIVI	38 (413)	9,2	34,2	2,4	0,7	3,1
	SIVI	35 (496)	7,0	71,4	4,4	0,6	5,0
6	KATI	86 (734) *	11,7	39,5	3,3	1,3	4,6
	YARI SIVI	36 (629)	5,7	61,1	2,5	0,9	3,4
	SIVI	22 (476)	4,6	63,6	2,7	0,2	2,9

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. ANTERLERDEN OLUŞAN HÜCRE YIĞINLARI

Başlangıç besi ortamına inoküle edilen anterler üzerinde, embryoidlerle birlikte embryoid-kallus ve kallus hücre yığınları da oluşmuştur. Regenerasyon besi ortamına bunların her üçünün de aktarılmasına rağmen, sadece embryoidler regenerere olmuş, diğerleri gelişme göstermemişlerdir. Bu nedenle de tablo'larda kallus ve kallus-embryoid verilerine yer verilmemiştir. Yapmış olduğumuz çalışmada, sadece embryoidlerin verimli, diğerlerinin verimsiz olması bunları meydana getiren hücrelerin farklı olabileceği düşüncesini ortaya çıkarmaktadır. HUANG(1984b), hücre yığınlarının farklılaşması ve yapısı üzerine yaptığı araştırmalarda, embryoidlerin; stoplazmaca zengin, iyi gelişmiş mitokondri ve plastidlere sahip hücrelerin meydana getirdiği 2 veya 3 katmandan oluştuklarını, bu nedenle de farklılaşarak kök ve gövdecik oluşturma kabiliyetine sahip olduklarına gözlemiştir. Kallus'ların ise, büyük nukleus'lara sahip hücrelerden meydana geldiklerini, farklılaşmadıklarına ve regenerasyon besi ortamına aktarıldıklarında dejenere olduklarını bildirmiştir (HU AND HUANG 1987). Diğer taraftan anterin anatomik yapısı göz önüne alındığında; anter üzerinde farklı yerlerde bulunan hücrelerin, besi ortamı veya inkübasyon koşullarından farklı şekilde etkilenebileceği düşüncesi, bir anter üzerinde embryoid, embryoid-kallus ve kallus oluşumlarının nasıl meydana geldiğinin bir yanıtı olabilir.

4.2. BUĞDAYDA ANTER KÜLTÜRÜ ÜZERİNE GENOTİPİN ETKİSİ

Yapılan denemeler sonucunda, donör bitki genotip'lerinin anter kültür çalışmalarında yeşil bitki oluşturma bakımından gösterdikleri varyasyon, anter kültürü tekniğinin bitki ıslah programlarında geniş olarak kullanımını sınırlandıran en önemli faktördür. Bu varyasyonun genotip-çevre ilişkilerinden dolayı ortaya çıkabileceği açıklanmaktadır (LAZAR ET AL., 1984; SIMONDS 1989). Diğer taraftan, haploid bitkilerin elde edilmesindeki aşamalar olan embryoid oluşumu, bitki regenerasyonu ile yeşil bitki gelişimi genetik olarak birbirinden bağımsız gen yada genler tarafından kontrol edildiğine dair bilgiler olup (LAZAR ET AL., 1984; DEATON ET AL., 1987; SZAKACS ET AL., 1988), elde ettiğimiz sonuçlar da bu durumu teyit etmektedir.

1 no'lu araştırma materyali 2,5 ve 6 no'lu çeşitlere nazaran daha az miktarda embryoid oluşturmaya karşın,yüksek değerlerde bitki regenerasyonu ve yeşil bitki oluşumu sağlamıştır.Diğer taraftan 2 no'lu çeşidin embryoid verimi,en yüksek olmasına rağmen;bitki regenerasyonu ve yeşil bitki gelişimi diğer çeşitlere göre düşük olmuştur(Tablo 1,Tablo 5).Bunun yanında 1B/1R translokasyonlu kromozom zomlara sahip olan genotiplerin yeşil bitki oluşturma kabiliyetlerinin daha fazla olduğu,ayrıca bu kromozoma sahip buğday çeşitlerinde pas ve külleme hastalıklarına dayanıklılık olduğu ve bu bitkilerin buldukları ortama adaptasyon yeteneklerinin de yüksek olduğu bildirilmiştir(RAJAREM ET AL.,1983;HENRY AND DE BUYSER 1985; AGACHE ET AL.,1989).Araştırmada kullanılan 1,2 ve 5 no'lu donör bitkilerin embryoid,bitki regenerasyonu ve yeşil bitki oluşturma yeteneklerinin ortaya çıkmasını sağlayan genleri translokasyon yoluyla içerdikleri bilinmektedir.İncelenen bitkilerden translokasyonlu olanların,yeşil bitki verimi bakımından translokasyonsuz örneklerle oranla daha yüksek değerler gösterdikleri saptanmıştır (Tablo 5).Ancak translokasyonsuz bir örnek olan 6 no'lu genotipin deneme sonunda meydana getirdiği toplam bitkicik sayısının(%4.6), diğerlerine göre en yüksek olduğu ve yukarıdaki ifadeye ters düştüğü görülmüştür.Bu durum bir deney hatası mı,yoksa 6 no'lu çeşidin gerçekten genotipinden mi kaynaklandığı tartışmalıdır.

4.3. DONOR BİTKİLERİN YETİŞTİRİLDİĞİ ÇEVRE İSİSİNİN EMBRYOID OLUŞUMU VE BİTKİ GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİSİ

Yeşil bitkilerin gelişiminin,donor bitkilerin yetiştirildiği çevre koşullarıyla ilişkili olduğu; düşük sıcaklıklarda yetiştirilen donör bitkilerden elde edilen anterlerin daha fazla embryoid oluşturdıkları,bunun yanında albino bitki sayısının da düşük olduğu belirtilmiştir(SİMONDS 1989).1,2,3 no'lu çeşitler 18°C de hiç albino bitkicik oluşturmadıkları halde,23°C de albino bitkiler gözlenmiştir.6 no'lu buğday çeşidi ise yukarıdaki sonucun tam tersini göstermiştir.Buna göre; embryoid oluşumu üzerine,sıcaklık faktörü ve genotipin karşılıklı etkileşim içinde oldukları anlaşılmıştır(Tablo 1,Tablo 6).Literatür bilgisiyle de uygunluk göstermektedir(SİMONDS 1989).Genotip-çevre ilişkisinin varlığı,her genotipin istediği sıcaklık isteğinin farklı olduğu gerçeğini ortaya koymaktadır.

4.4. EMBRYOİD OLUŞUMU ÜZERİNE BESİ ORTAMININ ETKİSİ

Buğday anter kültüründe,embryoid verimi üzerine katı besi ortamının,diğer yarı-katı ve sıvı besi ortamlarına nazaran daha iyi sonuçlar verdiği görülmüş olup(Tablo 7) benzer duruma Tütün ve Pirinç ile yapılan çalışmalarda da rastlanmıştır(SUNDERLAND AND ROBERT 1977; CHEN ET AL.,1980;HENRY AND DE BUYSER 1981).

Sıvı besi ortamları,kültür kaplarının bir yerden diğer bir yere taşınmasındaki zorluklar ve çok kolay kontamine olabilmeleri gibi nedenlerle katı besi ortamlarına nazaran olumsuzluklar içermektedirler.Fakat katı besi ortamlarına göre olumlu yönleri de bulunmaktadır.Sıvı besi ortamları;tuz(YE ET AL.,1987) PH,CaCO₃(kireç) gibi maddelere dayanıklı bitki formlarının elde edilebilmesine iz, mikro ve makro besi elementlerinin olumlu ve olumsuz etkilerinin in incelenmesine olanak sağlamaları nedeniyle tercih edilmektedirler. Anter inoküle edilmiş sıvı besi ortamları gerektiğinde bir pipet yardımıyla alınarak,yerine çeşitli amaçlarla yeni besi ortamları konulabilmektedir.Bu ise bilimsel çalışmalarda çeşitli kolaylıklar sağlamaktadır.

5. YAZINSAL KAYNAKLAR

- 1- Anderson S.B., Due I.K., Olsen A., 1987. The Response of Anther Culture in a Genetically Wide Material of Winter Wheat (*T. aestivum* L.). *Plant Breeding* 99: 181-186.
- 2- Agache S., Bachelier B., De Buyser J., Henry Y., Snape J., 1989. Genetic Analysis of Anther Culture Response in Wheat Using Aneuploid, Chromosome Substitution and Translocation Lines, *Theor. Appl. Genet.* 77:7-11.
- 3- Blakeslee A.F., Belling J., Farnham M.E., Berger A.D., 1922. Haploid Mutant in the Jimson Weed *Datura stramonium*. *Science* 55: 646-647.
- 4- Bourgin J.P., Nitsch N.P., 1967. Obtention de *Nicotiana* Haploides a Partir d' etamines Cultivees in Vitro. *Ann. Physiol. Veg.* a: 377-382.
- 5- Bullock W.P., Baenziger P.S., Schaeffer G.W., Battino P.J., 1982. Anther Culture of Wheat (*T. aestivum* L.) F_1 's and Their Reciprocal Crosses. *Theor. Appl. Genet.* 62:155-159.
- 6- Chen Y., Wang R.F., Tian W.Z., Zou O.X., Zheng S.W., Lu D.Y., Zhang G.H., 1980. Studies on Pollen Culture in Vitro and Induction of Plantlets in *Oryza sativa* subsp. Keng. *Acta Genet. Sin.* 7: 46-54.
- 7- Chu C.C., Wang C.C., Sun C.S., Chien N.F., Yin K.C., Hsu C., 1973. Investigation on the Induction and Morphogenesis of Wheat (*T. aestivum*) Pollen Plants. *Acta Bot. Sin.* 15:1-11.
- 8- Chu C.C., 1978. The N_6 Medium and its Application to Anther Culture of Cereal Crops. In Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture. Science Press, Peking. PP.43-50.
- 9- Chu C.C., Hill R.D., 1988. An Improved Anther Culture Method for Obtaining Higher Frequency of Pollen Embryoids in (*T. aestivum*) *Plant Science*, 55: 175-181.
- 10- Clapham D., 1971. In Vitro Development of Callus From the Pollen of *Lolium* and *Hordeum*. *Z. Pflanzenzüchte.* 65:285-292.

- 11- Daofen H.,1986.Jinghua No 1,a Winter Wheat Varietry Derived From Pollen Sporophyte:P.67-78.In H.Hu and H.Yang(ed.) Haploids of Higher Plants in Vitro.China Academic Publishers,Beijing.
- 12- Deaton W.R.,Metz S.G.,Armstrong T.A.,Mascia P.N.,1987.Genetic Analysis of the Anther Culture Response of three Spring Wheat Crosses.Theor.Appl.Genet.74:334-338.
- 13- De Buyser J.,Henry Y.,1979.Androgenese sur Des Bles Tendres En Cours De Selection.1.L'Obtention Des Plantes in Vitro.Z.Pflanzenzücht 83:49-56.
- 14- De Buyser J.,Henry Y.,Talep G.,1985.Wheat Androgenesis.Cytogenetical Analysis and Agronomic Performance of Doubled Haploids.Z.Pflanzenzuecht.95:23-34.
- 15- De Buyser J.,Henry Y.,Lonnet P.,Hertzog R.,Hepsel A.,1987. "Florin":A Doubled Haploid Wheat Variety Developed by Anter Culture Method.Plant Breeding 98:53-56.
- 16- Ding G.H.,Quyong J.W.,1984.Callus and Plantlet Formation From Cultured Wheat Anthers at the Different Developmental Stages.Plant Sci.Lett. 33: 71-79.
- 17- Ekiz H.,1990.Nuclear x Cytoplasm Interactions Controlling Anther Culture Response in Wheat (T.aestivum L.) Master Tezi.Washington State University Department of Agronomy and Soils.
- 18- Forough-Wehr B.,Friedt W.,Wenzel G.,1982.On the Genetic Improvement of Androgenetic Haploid Formation in Hordeum vulgare L.Theor.Appl.Genet. 62: 233-239.
- 19- Foroughi-Wehr B.,Friedt W.,1984.Rapid Production of Recombinant Barley Yellow Mozaic Virus Resistant Hordeum vulgare Lines by Anther Culture.Theor.Appl.Genet.67:377-382.
- 20- Gönülşen N.,1987.Bitki Doku Kültürleri.Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü.Yayın No: 78.
- 21- Guha S.,Moheswari S.C.,1964.In Vitro Production of Embryo From Anther of Datura.Nature 204:497-

- 22- Henry Y., De Buyser J., 1981. Float Culture of Wheat Anthers. *Theor. Appl. Genet.* 60:77-90.
- 23- Henry Y., De Buyser J., 1985. Effect of the 1B/1R Translocation on Anther Culture Ability in Wheat (T.aestivum L.) *Plant cell Reports* 4: 307-310.
- 24- Hu H., 1986. Variability and Gamete Expression in Pollen-Derived Plants in Wheat. P.137-148. In H. Hu, H. Yang (ed.) *Haploids of Higher Plants in Vitro*. China Academic Publishers, Beijing.
- 25- Hu H., Huang B., 1987. Application of Pollen-Derived Plants to Crop Improvement. *International Review of Cytology* vol.107:298-299.
- 26- Huang B., 1986. Ultrastructural Aspects of Pollen Embryogenesis in Hordeum, Triticum and Paeonia. P.91-117. In H. Hu, H. Yang (ed.) *Haploids of Higher Plants in Vitro*. China Academic Publishers, Beijing.
- 27- Inagaki M.N., 1985a. Embryo Culture of Wheat Cultivar Norin 61 Crossed With Hordeum bulbosum L. *Japan J. Breed.* 35: 59-64.
- 28- Jensen C.J., 1976. Barley Monoploids and Doubled Haploids: Techniques and Experience. *Barley Genetics III*:316-345. (Proceedings of the 3rd International Barley Genetics Symposium, Garching, 1975).
- 29- Jones A.M., Petolino J.F., 1987. Effect of Donor Plant Genotype and Growth Environment on Anther Culture of Soft Red Winter Wheat (T.aestivum L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 8:215-223-
- 30- Kameya T., Hinata K., 1970. Induction of Haploid Plants From Pollen Grains of Brassica. *Jap. S. Breed.* 20:82-87.
- 31- Lazar M.D., Schaeffer G.W., Baenziger P.S., 1984. Cultivar and Cultivar x Environments Effects on the Development of Callus and Polyhaploid Plants From Anther Culture of Wheat. *Theor. Appl. Genet.* 67: 273-277.

- 32- Lazar M.D., Schaeffer G.W., Baenziger P.S., 1985. The Physical Environment in Relation to High Frequency Callus and Plantlet Development in Anther Cultures of Wheat (T.aestivum) CV Chris. *J. Plant Physiol.* 121:103-109.
- 33- Liang H., Zhang H., Yu X., 1980. Preliminary Studies on Conditions for Initiation of Differentiation of Pollen Cells and the Changes of Anther Wall Tissues in Anther Cultures. *Acta Phytophysiol. Sin. China* 6: 19-28.
- 34- Liang G.W., Xu A., Tang H., 1987. Direct Generation of Wheat Haploids Via Anther Culture. *Crop Sci.* 27:336-339.
- 35- Li C.L., 1978. Effects of Temperature and Illumination on Induction of Pollen Plants in Wheat. In: Hu H. et al., (eds). *Proc. Symp. Anther Culture Science Press, Beijing*, P:290.
- 36- Lyne R.L., Bennet R.I., Hunter C.P., 1984. Embryoid and Plant Production From Cultured Barley Anther. Butter Worth. PUBLISH. Guildford.
- 37- Marsolais A.A., Kasha K.J., 1985. Callus Induction From Barley Microspores. The Role of Sucrose and Auxin in a Barley Anther Culture Medium. *Can. J. Bot.* 63:2209-2212.
- 38- Miller C.O., 1963. Kinetin and Kinetin Like Compounds. In: Linskens HF, Tracey MV (Hrsg) *Moderne Methoden in der Pflanzenanalyse*. Springer, Berlin Heidelberg NewYork, Bd 6, S 194-202.
- 39- Murashige T., Skoog F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays With Tobacco tissue Cultures *Physiol. Plant.* 15:472-497.
- 40- Nitsch J.P., Nitsch C., Loerey P.P., 1969. Obtention de Mutants a' Partir de Nicotiana Haploides Issus de Grains de Pollen. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 269:1650-1652.
- 41- Pan C.L., Pan S.H., Kuan C.L., Mu H.H., 1975. Certain Factors Affecting the Frequency of Induction of Wheat (T.vulgare) Pollen Plants. *Acta Bot. Sin.*, 17: 161-166.
- 42- Pan C.L., Kao K.H., 1978. The Induction of Wheat Pollen Embryo and the Influence of Some Factors on its Frequency of Induction. In: *Proc. Symp. Plant Tissue Culture*. Science Press. Beijing. PP:133-142.

- 43- Palsoni L., Kott L.S., Beversdorf W.D., 1988. Large Scale Microspore Culture Technique for Mutation Selection Studies in Brassica napus. *Can. J. Bot.* 66:1681-1685.
- 44- Picard and De Buyser, 1973. Obtention de Plantules Haploïdes de T.aestivum, a partir de Culture d'Anthers in Vitro. *C.R.Acad.Sc.Paris.* 277:1463-1466.
- 45- Pieric R.L.M., 1987a. Preparation and Composition of Nutrient Media. P.45-82. In *in Vitro Culture of Higher Plants*. Martinus Nishoff Publishers, New York
- 46- Pieric R.L.M., 1987b. The Production of Haploïds. P.243-257. In *in Vitro Culture of Higher Plants*. Martinus Nishoff Publishers, New York.
- 47- Purnhauser L., Medgyesy P., Czako M., Dix P.J., Marton L., 1987. Stimulation of Shoot Regeneration in T.aestivum and Nicotiana Plumbaginifolia Viv. Tissue Cultures Using the Ethylene Inhibitor AgNO₃. *Plant cell Reports.* 6:1-4.
- 48- Quyang J.W., Hu H., Chuang C.C., Tseng C.C., 1973. Induction of Pollen Plants From Anthers of T.aestivum L. Cultured in Vitro. *Scientia Sinica* 16:79-95.
- 49- Quyang J.W., Zhou S.M., Jia S.E., 1983. The Response of Anther Culture to Temperature in T.aestivum L. *Theor. Appl. Genet.* 66:101-109.
- 50- Quyang J., 1986. Induction of Pollen Plants in T.aestivum In: *Haploïds of Higher Plants in Vitro*. Beijing, China: 137-145.
- 51- Rajaram S., Mann C.E., Ortiz Ferrara G., Mujeeb-Kazi A., 1983. Adaptation, Stability and High Yield Potential of Certain 1B/1R CIMMYT Wheats, Pages 613-621, In: *Proc. 6th International Wheat Genetics Symposium, Kyoto, Japan*
- 52- Raquin C., 1982. Genetic Control of Embryo Production and Embryo in Anther Culture of *Petunia*. *Theor. Appl. Genet.* 63:151-154.
- 53- Sagi L., Barnabas B., 1989. Evidence for Cytoplasmic Control of in Vitro Microspore Embryogenesis in the Anther Culture of Wheat (T.aestivum). *Theor. Appl. Genet.* 78:864-872.

- 54- Schaeffer G.W., Baenziger P.S., Worley J., 1979. Haploid Plant Development From Anthers and in Vitro Embryo Culture of Wheat. *Crop Sci.* 19:697-702.
- 55- Simonds J., 1989. Improved Androgenesis of Winter Cultivars of T.aestivum L. in Response to Low Temperature Treatment of Donor Plants. *Plant Science*, 65:225-231.
- 56- Sunderland N., Robert M., 1977. New Approach to Pollen Culture. *Nature* 270:236-238.
- 57- Szakacs E., Kovacs G., Pauk J., Barnabas B., 1988. Substitution Analysis of Callus Induction and Plant Regeneration From Anther Culture in Wheat (T.aestivum). *Plant Cell Reports* 7:127-129.
- 58- Wang C.C., Chen Y.R., 1980. Effects of Growth Conditions of Anther Donor Plants on the Production of Pollen Plants in Wheat Anther Culture. *Acta. Genet. Sin.* 7:64-71.
- 59- Wei Z.M., 1982. Pollen Callus Culture in T.aestivum. *Theor. Appl. Genet.* 63:71-73.
- 60- Yang N.Y., Zhou C., 1982. In Vitro Induction of Haploid Plants From Unpollinated Ovaries and Ovules. *Theor. Appl. Genet.* 63:67-104.
- 61- Ye J.M., Kao K.N., Harvey B.L., Rosnagel B.G., 1987. Screening Salt Tolerant Barley Genotypes Via F₁ Anther Culture in Salt Stress Media. *Theor. Appl. Genet.* 77:426-429.
- 62- Zhang L.J., Anceau C., Lepoivre P., Seilleur P., Semal J., 1987. An Efficient Method for the Regeneration of Wheat (T.aestivum) From Anther Cultures. *Bull. Rech. Agron. Gembloux* 22:301-314.
- 63- Zhou H., Konzak C.F., 1989. Improvement of Anther Culture Methods For Haploid Production in Wheat (T.aestivum L.) *Crop Sci.* 29:817-821.
- 64- Zhvang J.J., Xu J., 1983. Increasing Differentiation Frequencies in Wheat Pollen Callus. P.431-432. In H. Hu and M.R. Vega (eds.) *Cell and Tissue Culture for Cereal Crop Improvement* Science Press, Beijing, PRC.