



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI ARPA GENOTİPLERİNDE DOKU KÜLTÜRÜ UYGULAMALARI İLE HAPLOİD BİTKİ ÜRETİMİNİN VE EMBRİYO KÜLTÜRÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Münüre TANUR ERKOYUNCU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tarla Bitkileri

Temmuz-2013
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI ARPA GENOTİPLERİNDE DOKU KÜLTÜRÜ UYGULAMALARI İLE HAPLOİD BİTKİ ÜRETİMİNİN VE EMBRİYO KÜLTÜRÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Münüre TANUR ERKOYUNCU

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Mustafa YORGANCILAR

2013, 72 Sayfa

Jüri
Yrd. Doç. Dr. Mustafa YORGANCILAR
Prof. Dr. Ali TOPAL
Yrd. Doç. Dr. Semiha ERİŞEN

Bu araştırma, farklı arpa genotiplerinde (Karatay-94, Bülbül-89, Karatay-94xBülbül-89) haploid bitki elde etmek için anterden androgenesisin uyarılması üzerine ön uygulama ve besin ortamlarının etkilerinin belirlenmesi ile bu genotiplerin olgun embriyolarından etkili bir kallus oluşumu ve bitki rejenerasyon sisteminin geliştirilmesi için yapılmıştır.

Araştırmanın haploid kültürü kısmında, arpa genotiplerinden *in vitro* koşullarda elde edilen başaklar 0, 4, 21 ve 28 gün süreyle 4°C'de soğuk ön işleme tabi tutulmuş ve bu başaklardan izole edilen anterler kallus uyarımı için BAC3, FHG, C3 ortamlarında kültüre alınmıştır. Dört haftalık kültür süresinin sonunda anterlerde bir şişmenin meydana geldiği ve flamentlerinin uzadığı görülmüş fakat kallus oluşumu meydana gelmemiştir.

Araştırmanın embriyo kültürü kısmında, farklı arpa genotiplerinin (Kartay-94, Bülbül-89, Karatay-94xBülbül-89) olgun embriyoları kullanılarak, kallus oluşumu üzerine, besin ortamının (MS_1 ve MS_2), oksin tipinin (2,4-D, dikamba, pikloram ve 2.4.5-T), ve dozlarının (2, 4, 6 mg/l), yeşil bitki rejenerasyonu üzerine ise sitokinin tipinin (TDZ, BAP) ve dozlarının (0.2, 0.5, 1 mg/l) etkileri incelenmiş olup tüm genotiplerde kallus ve sürgün oluşumu sağlanmıştır.

Sonuç olarak bu arpa genotiplerinde, haploid bitki üretimi için anter kültürü çalışmalarında önemli bir unsur olan, uygun mikrospor aşamasındaki başak morfolojisi belirlenmiş ancak anterlerin kallus uyarımı sağlanamamıştır. Embriyo kültüründe ise, genotipe göre farklılık göstermekle birlikte genel anlamda en uygun ortam MS_1, kallus oluşumu açısından en uygun büyüme düzenleyicisi ve dozu 4 mg/l dikamba, sürgün oluşumu açısından en uygun büyüme düzenleyici ve dozu 1 mg/l BAP olarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Anter kültürü, Arpa, Embriyo kültürü, Kallus, Olgun embriyo

ABSTRACT

MS THESIS

THE RESEARCH OF ANTHER CULTURE FOR HAPLOİD PLANT PRODUCTION AND EMBRYO CULTURE OF SOME BARLEY GENOTYPES

Münüre TANUR ERKOYUNCU

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY

THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE FIELD CROPS

Advisor: Asst. Prof. Dr. Mustafa YORGANCILAR

2013, 72 Pages

Jury

Advisor: Asst. Prof. Dr. Mustafa YORGANCILAR

Prof. Dr. Ali TOPAL

Asst. Prof. Dr. Semiha ERİŞEN

In this study, effects of different cold pretreatment and different medium on simulation of androgenesis from anther on different barley genotypes (Karatay-94, Bülbül-89, Karatay-94xBülbül-89) for maintaining haploid plant, formation of effective callus from these genotypes' mature embryo, improving plant regeneration system and response of some barley genotypes to cell culture were aimed to investigate.

In the haploid culture section of the study, spikes which were obtained from barley genotypes with *in vitro* conditions were cold pretreatment 0, 4, 21 and 28 days in 4 ^{o}C and anthers which were isolated from these spikes were taken to BAC3, FHG, C3 medium for excitation callus. Resulting swell in the anthers and growing height of filament were observed, however formation of callus did not come in existence.

In the embryo culture section of the study, using mature embryo of different barley genotypes (Kartay-94, Bülbül-89, Karatay-94xBülbül-89), effect of medium (MS_1 ve MS_2), auxin type (2,4-D, dikamba, pikloram ve 2.4.5-T) and doses (2, 4, 6 mg/l) on callus formation and effect of cytokinin type (TDZ, BAP) and doses (0.2, 0.5, 1 mg/l) on green plant regeneration were investigated. Callus and shoot formation was successful for all genotypes.

As a result, spike morphology which is an important factor in anther culture studies for haploid plant production and is in the suitable microspor phase was determined, however callus growing could not be succeed. In embryo culture, as well as changing with genotype, MS_1 as the best medium generally, dikamba with 4 mg/l as the best growth promoter for callus formation and BAP 1 mg/l as the best growth promoter for shoot formation were determined.

Keywords: Anther culture, Callus, Embryo culture, Mature embryo

ÖNSÖZ

Tez çalışmam boyunca, her türlü desteği sağlayan, ilgi ve tecrübesini esirgemeyen danışman hocam, Sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa YORGANCILAR'a ve Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Ali TOPAL hocama en içten teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmanın planlanmasından yürütülmesine ve sonuçların değerlendirilmesine kadar her aşamasında bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım hocalarım, Sayın Yrd. Doç. Dr. Semiha ERİŞEN'e ve Sayın Dr. Emine ATALAY'a, laboratuvar çalışmaları sırasında yardımını esirgemeyen yüksek lisans öğrencisi sevgili Buse AYDIN'a ve destekleriyle her zaman yanımda olan çok değerli çalışma arkadaşım Sayın Arş. Gör. Kevser YAZAR 'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca gösterdiği büyük anlayış, sabır ve desteklerinden dolayı sevgili eşime, her zaman yanımda olan sevgi, emek ve dualarını esirgemeyen başta annem olmak üzere tüm aileme teşekkür ederim.

Münüre TANUR ERKOYUNCU

KONYA-2013

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

ÖNSÖZ ..... **vi**

İÇİNDEKİLER ..... **vii**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **viii**

1. GİRİŞ **1**

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **4**

2.1. Haploid Kültürü Tekniği 4
2.1.1. Haploid ve double haploid nedir? 4
2.1.2. Anter kültürü 6
2.2. Embriyo Kültürü Tekniği 17

3. MATERYAL VE METOD **28**

3.1. Materyal 28
3.2. Metod 28
3.2.1. Anter kültürü 28
3.2.2. Embriyo kültürü 35

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA **41**

4.1. Anter Kültürü 41
4.1.1. *In vitro* şartlarda donör bitkilerin yetiştirilmesi 41
4.1.2. Uygun mikrospor safhasının belirlenmesi ve donör bitkilerin hasadı 41
4.1.3. Ön uygulama ve kallus teşvik ortamlarında anterlerin gelişme durumu 42
4.2. Embriyo Kültürü 44
4.2.1. Uygun oksin tipinin belirlenmesi 44
4.2.2. Kallus teşvik ortamının belirlenmesi 48
4.2.3. Sürgün teşvik ortamının belirlenmesi 54

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER **59**

5.1. Sonuçlar 59
5.2. Öneriler 60

KAYNAKLAR **62**

ÖZGEÇMİŞ **72**

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

Kg: Kilogram

°C: Santigrat Derece

mg/l: Miligram/Litre

g/l: Gram/ Litre

ml: Mililitre

mm: Milimetre

cm: Santimetre

a/h: Ağırlık/Hacim

Lux: Birim Alana Düsen Işık Akısı Ölçü Birimi

M: Molar

mM: Milimolar

µM: Mikromolar

Kısaltmalar

LSD: Least significant difference

QTL: Kantitatif özellik lokusları

H: Haploid

DH: Double-haploid

UV: Ultraviyole ışın

HCI: Hidroklorik asit

KOH: Potasyum hidroksit

EtOH: Etil alkol

atm: Atmosfer basıncı

N: Normalite

K.O: Kareler ortalaması

S.D: Serbestlik derecesi

B.O: Besin ortamı

B.D:Büyüme düzenleyicisi

1. GİRİŞ

Arpa (*Hordeum vulgare* L.), *Gramineae* (Buğdaygiller) familyası içinde yer alan diploid (2n=2x=14), tek yıllık bir tahıl türüdür. Dünya üzerinde insan ve hayvan beslenmesinde, malt üretiminde ve yenilenebilir enerji olarak önemli kullanım alanlarına sahip bir bitkidir (Schulze, 2007). Fizyolojik, morfolojik ve genetik açıdan çeşitlilik göstermesi, geniş ölçüde genetik stoklarının ve haritalarının bulunması ve kendi kendine döllenebilmesi sayesinde çok yönlü testlerin uygulanabilmesi gibi nedenler arpayı hem tarımsal açıdan hem de fizyolojik ve biyoteknolojik çalışmalar açısından önemli kılmaktadır (Evrensel, 2010).

Arpa dünyada geniş kullanım ve yayılış alanına sahip olmasına rağmen, kuraklık, tuzluluk ve besin maddesi yetersizliği gibi abiyotik, fungal enfeksiyon ve böcek zararı gibi biyotik stres faktörlerine hassasiyet göstermesi nedeniyle olumsuz çevre koşullarından etkilenmekte ve verimi oldukça düşmektedir (Um ve ark., 2007; Bankima ve Gaile, 2009).

Klasik bitki ıslahı çalışmalarından yararlanılarak üstün verimli ve kaliteli birçok çeşit geliştirilip, insanoğlunun hizmetine sunulmasına karşın, başta hastalık ve zararlı olmak üzere bazı biyotik ve abiyotik çevresel baskılara karşı dayanıklılıkta henüz istenilen sonuç tam olarak alınamamıştır. Klasik bitki ıslahı yöntemlerinden beklenen başarı, üzerinde çalışılan popülasyondaki genetik çeşitlilik ile doğru orantılıdır ve popülasyonda var olan çeşitliliğin daha da artırılması gerekmektedir. Genetik tabanda meydana gelen daralmadan dolayı tür içi genetik çeşitliliğin sınırlı kalması, klasik ıslah yöntemleriyle elde edilebilecek biyolojik verim artışını da sınırlamaktadır. Bundan başka klasik bitki ıslahı ile istenilen özellikte yeni bireyler elde edilmesi oldukça uzun zaman alan bir uğraş gerektirmektedir.

Günümüzde bitki ıslahçıları yüksek verimli, kaliteli ve stres faktörlerine dayanıklı yeni çeşitler geliştirmek üzere klasik bitki ıslahı programlarını tamamlayan, destekleyen ve hızlandıran biyoteknolojik yöntemlerden yararlanma yoluna gitmektedirler. Biyoteknolojinin sınırları çok geniş olup değişik uygulama alanlarını içine almaktadır. Bu uygulama alanlarından bir tanesi de doku kültürü uygulamalarıdır.

Doku kültürü uygulamalarından, double haploid (DH) teknolojisi; üstün özellikte bitkilerin seçilebilmesi için klasik ıslaha etkili bir şekilde yardımcı olan, klasik bitki ıslahı programlarını tamamlayan teknolojiler olarak ıslahta yer bulmuştur. Değişen dünya koşullarında, bitki ıslahında verim ve kaliteyi artırmanın yanında ıslah süresinin

kısaltılması da amaçlanmaktadır. Bu anlamda double haploid teknolojisi zirai açıdan önemli pek çok bitkinin ıslah programlarının hızlandırılmasında tamamlayıcı kısmı oluşturmaktadır.

Double haploid teknolojisi, heterozigot anne ve babadan tek adımda %100 homozigot saf hatların elde edilmesini sağlamaktadır. Yabancı döllenen türlerdeki 10-12, kendine döllenen türlerdeki 5-7 generasyonluk kendileme süresini tek generasyona indirerek mutlak homozigotluk elde edilebilmektedir. Böylece kombinasyon ıslahı ve F_1 hibrit çeşit ıslahı programlarında zaman yönünden önemli düzeyde kazanç sağlanabilmektedir. Ayrıca haploidler, her bir lokustaki allellerden sadece bir seriyi içermekte ve resesif mutasyonların açığa çıkartılmasına olanak sağlamaktadır ve bu özellikleriyle ıslah çalışmalarında önemli bir yer tutmaktadırlar (Ellialtıoğlu ve ark., 2001).

Haploid bitkileri elde etmek için birkaç değişik yöntem mevcuttur. Bunlar arasında en etkili ve geniş ölçüde kullanılanı anter kültürüdür (Germana, 2011a). Ancak, pek çok genotipin anter kültürüne yanıtının düşük olması ve yüksek frekansta albino bitkilerin oluşması bu tekniğin kullanılmasını sınırlamaktadır (Cistue ve ark., 1999). Arpada ise anter kültürü çalışmaları 1970'li yılların başında başlamış ve bu yöntemle geliştirilen Mingo (Ho ve Jones, 1980) çeşidi double haploid teknolojisinin ıslahta kullanımının yaygınlaşmasında kilometre taşı olmuştur.

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 araştırmalarda donör bitkilerin yetişme koşulları, mikrosporların gelişme devresi, anterlerin kültüre alınmadan önce veya sonra düşük sıcaklığa maruz bırakılması ve kültür ortamı anter kültüründe başarıyı etkileyen faktörler olarak ortaya çıkmıştır (Fadel ve Wenzel, 1990; Yıldırım ve ark., 1990; Flehinghaus ve ark., 1991; Hatipoğlu ve Genç, 1992; Daniel, 1993; Immonen, 1999; Dağüstü, 2002).

Tahıl ıslah çalışmalarında yararlanılan doku kültürü uygulamalardan biri de embriyo kültürü uygulamalarıdır. Embriyo kültürü yöntemleriyle, etkili ve tekrarlanabilen kallus kültürleri ile bitki rejenerasyon sistemleri oluşturulabilmektedir. Böylece kültüre alınan bitki hücrelerine ya da dokularına *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla veya partikül bombardımanı ile gen aktarımı yapılabilmekte, daha sonra gen aktarılmış bitki kısımları uygun besin ortamında olgun bitki haline getirilerek, aktarılan geni taşıyan transgenik bitkiler elde edilebilmektedir. Yine, doku kültürü sırasında

meydana gelen kalluslardan farklılaşan bitkiler arasında görülen somaklonal varyasyondan ıslah programlarında yararlanılabilmektedir. Ayrıca, *in vitro* ortamda kimyasal ve fiziksel mutagen uygulamaları ile hastalıklara, antibiyotiklere, herbisitlere, tuza, düşük sıcaklığa ve kuraklığa toleranslı veya dayanıklı mutant hücre seçimleri yapılabilmektedir (Karaca ve Bürün, 1999).

Tahıllarda, gen transfer metotlarıyla gerçekleşen genetik çalışmalar ve diğer biyoteknolojik gelişmeler, etkili ve tekrar edilebilen bir bitki rejenerasyon sisteminin oluşturulmasına bağlıdır. Ancak, genotipe bağlılık, düşük rejenerasyon frekansı, albinisim ve rejenerant bitkilerde fertilite oranının düşük olması, bitki rejenerasyon sistemlerinde hala önemli bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır (Sharma ve ark., 2005).

Önceki yıllarda yapılan embriyo kültürü çalışmalarının çoğunda rejenerasyon açısından değerlendirildiğinde, monokotil türler gibi inatçı bitkilerde olgunlaşmamış embriyoların en iyi explant kaynağı olduğu bildirilmiştir (Tiidema ve Truve, 2004). Günümüzde ise bitki rejenerasyonu için kullanılan explantlar yeniden değerlendirilmiş ve olgun embriyolar ile çalışmalar yapılmıştır (Sharma ve ark., 2005; Ganeshan ve ark., 2006). Olgun embriyoların kullanımı, olgunlaşmamış embriyoların kullanımına kıyasla dikkat çekici avantajlar sağlamaktadır. Böylece donör bitkilerin, yoğun iş gücü zaman ve alan gerektiren kontrollü çevre şartları altında serada yetiştirilmesine gerek kalmamaktadır. Özellikle kışlık çeşitlerde vernalizasyon ihtiyacı ekstra zaman kaybına neden olmaktadır. Ayrıca kuru tohumlara yıl boyunca istenilen miktarlarda ulaşılabilmekte ve çevre şartlarının doku kültürüne etkisi ortadan kaldırılmaktadır (Dahleen, 1999). Tüm bu nedenlerden dolayı olgun embriyolar, tahıl doku kültürü çalışmalarında avantajlı explant kaynağı olarak görülmektedir. Ancak, olgun embriyoların rejenerasyon frekanslarının düşük olması büyük bir engel oluşturmaktadır. Olgun embriyolara uygulanan mekanik ve kimyasal *in vitro* teknikler (Sharma ve ark., 2005), embriyoları endosperm destekli kültüre alma işlemleri (Bartok ve Sagi, 1990; He ve Jia, 2008) rejenerasyon etkinliğini geliştirmek için başarılı bir şekilde kullanılmaktadır.

Bu araştırma üç arpa genotipinde, haploid bitki elde edebilmek için soğuk ön uygulamalarının ve besin ortamlarının anterden androgenesisin uyarılması üzerine etkilerinin belirlenmesi ve genotiplerin olgun embriyolarından etkili bir kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu sisteminin geliştirilmesi amacıyla yapılmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Haploid Kültürü Tekniği

2.1.1. Haploid ve double haploid nedir?

Somatik hücrelerinde, ait olduğu bitki türünün gamet hücrelerinde bulunan kromozom sayısı kadar kromozoma sahip olan bitkilere Haploid Bitkiler denir. Bitki türünün diploid (2n=2x) olması halinde bunların haploidleri n=x şeklinde olup, aynı zamanda 'monoploid' dirler ve her kromozom çiftinden birer tane bulundururlar. Bunlara 'monohaploid' de denilmektedir (Germana, 2011b). Poliploid bitki türlerinden elde edilen haploidler ise, bir kromozom setinden daha fazlasına sahiptirler (Murovec ve Bohanec, 2011). Örneğin; türün tetraploid (2n=4x) yapıda olması durumunda, haploidler 1n=2x şeklinde olup, her kromozomdan ikişer tane taşımaktadırlar (Kasha ve Maluszynky, 2003). Haploidlerin kromozom sayılarının bazı kimyasal maddeler yardımıyla ya da kendiliğinden katlanması yoluyla elde edilen bitkilere de Double Haploid Bitkiler denilmektedir.

Bitkilerde ploidi düzeyine göre hücrelerin boyutları değişmektedir. Bundan dolayı bitkilerin doku ve organlarını oluşturan hücreler; haploidlerde, double haploidlere kıyasla biraz daha küçük olduğundan, haploid bitkiler de morfolojik olarak double haploidlerin küçültülmüş örnekleridir. Haploid bitkiler normal bir bitkide bulunan tüm organlara sahip olup, hücreleri daha küçük olduğundan morfolojik olarak zayıf, güçsüz, bodur ve daha küçük yapılı bitkiler olup gelişimleri daha yavaştır. Yaprakları dar ve küçük, gövde ve dallarda boğum araları kısa iken, çiçeklenme süresi daha uzundur. Küçük çiçek açarlar ancak sterildirler ve tohum bağlamazlar. Polenleri küçük, anormal şekilli ve içleri boş olup, bu polenlere sahip anterler çatlamaz. Plastid sayıları azdır. Ayrıca stomaları daha küçüktür ve birim alanda daha fazla stoma taşırlar (Emiroğlu, 1982; Er, 1992; Ellialtıoğlu ve ark., 2001; Kuru ve Ergene, 2005). Bu özelliklerinden dolayı normalde hiç bir tarımsal değer taşımayan haploid bitkiler; bitki ıslahı genetik, sitolojik, fizyolojik, biyolojik ve biyokimyasal çalışmalar için son derece önemli ve değerli materyallerdir.

Haploidi teknikleri özellikle ıslah çalışmalarında, yabancı döllenen türlerdeki 10-12, kendine döllenen türlerdeki 5-7 generasyonluk kendileme süresini tek generasyona indirerek mutlak homozigotluğu sağlar. Dioik türlerde veya kendileme

depresyonu nedeniyle klasik yöntemlerle homozigotluğa ulaşmanın zor olduğu türlerde, bu sorun tek bir generasyonda çözülebilirken, uzun gençlik kısırlığına sahip çok yıllık meyve ağaçları ve orman bitkilerinde homozigotluk elde etmede çok büyük avantajdır. F_1 hibrit çeşit ıslahında, dihaploid bitkilerden elde edilen safhatlar ebeveyn olarak kullanılabilir. Mikrosporlardan oluşan embriyolar yüksek rejenerasyon kapasitesine sahip oldukları için direkt DNA ve gen transferi çalışmalarında etkin şekilde faydalanılabilmektedir. Ayrıca, haploid hücre veya protoplastlar sayesinde farklı patojenler ve bunların fizyolojik ırklarına, antibiyotiklere, toksinlere, herbisitlere, tuza, soğuğa veya sıcağa dayanıklı mutantlar *in vitro* seleksiyon imkânı ile küçük bir alanda çok kısa sürede, ekonomik şekilde seçilebilmektedir. Bunların dışında; ıslah etkinliğinin arttırılmasında, saf süper erkek bireyler elde edilmesinde, mutasyon ıslahında, süs bitkilerinin bodurlaştırılmasında, genom haritalarının çıkartılmasında, QTL analizlerinde polijenik karakterlerin haritalanmasında haploid bitkiler özellikle ıslahçı ve genetikçiler için sonsuz avantajlar sunmaktadır (Abak, 1986; Wenzel ve Foroughi - Wehr, 1994; Ferrie ve Keller, 1997; Hatipoğlu, 1999; Ellialtıoğlu ve ark., 2001).

Haploid bitkiler, bazı bitki türlerinde çeşitli doğal yollarla kendiliğinden oluşabilmektedir. Rakamsal olarak 100'ü aşkın bitki türünde doğal haploidlerin oluştuğu bildirilmiştir (Kasha, 1974). Ancak yetersiz ve düzensiz çıkışları nedeniyle doğal haploid oluşumunu esas alarak ıslah programlarını planlamak ve gerçekleştirmek mümkün görünmemektedir. Islah programlarında kullanılabilecek sayıda ve düzenli olarak haploidlerin mutlaka elde edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla araştırıcılar tarafından değişik yöntemler geliştirilmiş olup, bunlar genel anlamda 3 temel başlık altında toplanmaktadır.

Spontan yolla: İlk kez 1922 yılında Blakeslee ve araştırma grubu tarafından *Datura stramonium* bitkisinde yapılan bir çalışmada doğal olarak ortaya çıkan ve haploid olarak adlandırılan bir bitkide kromozom sayısının, gamet hücrelerinde bulunması gereken sayıda olduğu belirlenmiştir. Doğada androgenesis, gynogenesis, semigami, polyembriyoni veya kromozom eliminasyonu yollarından birisi ile oluşan spontan haploidlerin oluşum frekansı % 0.001–0.01 gibi düşük seviyelerde kalmakta; birçok türde ise doğal haploid oluşumuna hiç rastlanmamaktadır (Pocard ve Dumas de Vaulx, 1971).

***In situ* uyartımla:** Uzak akrabalar arası melezlemeler, tozlamanın geciktirilmesi, abortif veya ışınlanmış polenlerle tozlama, sıcaklık şokları, değişik

kimyasallar, hormon uygulamaları, “X” veya “UV” ışınları ile haploid bitki elde edilebilmektedir (Arı, 2006).

***In vitro* uyartımla:** Androgenesis (anter veya mikrospor kültürü) veya gynogenesis (ovül kültürü, ovaryum kültürü) yöntemleri ile laboratuvar koşullarında haploid bitki elde edilebilmektedir. *In vitro* uyartım metotlarından androgenesiste bitkinin erkek üreme organları (anter veya mikrospor), gynogenesiste ise bitkinin dişi üreme organları (ovül veya ovaryum) yapay besin ortamlarında kültüre alınmaktadır. Her iki yöntemde de temel prensip; normal koşullarda mikrospor veya megaspor hücresinin gametofitik gelişimini durdurarak, çeşitli uyartılar yardımıyla embriyonik gelişmeye zorlamaktır (Arı, 2006).

2.1.2. Anter kültürü

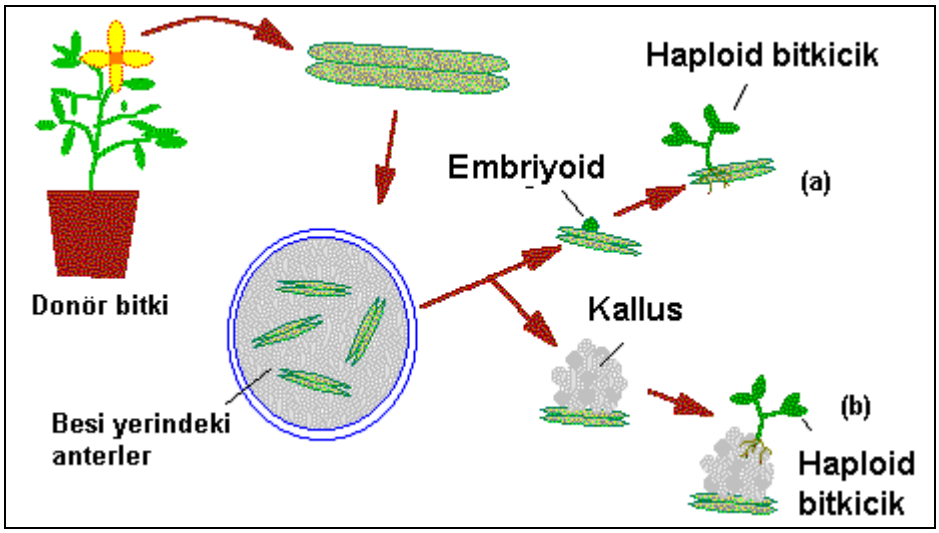
Bu teknikte ilk önemli gelişmeyi, 1964 yılında Guha ve Maheswari gerçekleştirmiş, *Datura innoxia* bitkisinin kültüre alınan anterlerinde mikrosporlardan haploid embriyo oluşumu sağlanmıştır (Guha ve Maheswari, 1964). Sonraki yıllarda Bourgin ve Nitsch (1967) tütün (*Nicotina tabaccum*) türünde anter kültürü yoluyla, tam bir haploid bitkiyi elde etmeyi başarmışlardır.

Anter kültürü esas olarak; içerisinde olgunlaşmamış polenleri bulunduran anterlerin, tomurcuklardan ayrılarak *in vitro* koşullarda yapay besin ortamlarına yerleştirilmesi ve burada olgunlaşmamış polenlerden haploid embriyolar elde edilmesi olayına verilen isimdir. Anter kültürü yapılarak normal koşullarda iki çekirdekli yapıya dönüşecek olan polen tanesinin gametik gelişme yönü; henüz tek çekirdekli dönemdeyken somatik gelişme yönüne doğru çevrilmekte ve böylece ‘mikrospor androgenesis’ veya sadece ‘androgenesis’ olarak adlandırılan oluşum gerçekleşmektedir (Ellialtıoğlu ve ark., 2001).

Mikrosporların, kültür koşulları ve yapılan uygulamaların etkisiyle; normal ve sağlıklı bir çiçek tozu oluşumuyla sona eren gametofitik doğrultudaki gelişme yerine, haploid embriyo oluşumuyla sona eren sporofitik yöndeki gelişmeye doğru yönlendirilebilmesi için mutlaka buna uygun gelişme döneminde bulunması gerekmektedir. Bu dönem, tek çekirdekli (uninucleate) mikrospor gelişme dönemi ve birinci polen mitozundan hemen önceki dönemdir (Ellialtıoğlu ve ark., 2001).

Anterler normal koşullarda ilk iki hafta içerisinde polen embriyogenesisi yönünde gelişmeye başlamaktadır. Ya doğrudan embriyo oluşumu gerçekleşerek 6-8

hafta içerisinde toprağa transfer edilebilecek gelişme düzeyine ulaşmış bitkiler elde edilebilmekte ya da haploid kallus dokusu oluşmakta ve kallustan bitki rejenerasyonu yoluna gidilmektedir (Şekil 2.1). Bunlardan ilkine direkt androgenesis, ikincisine indirekt androgenesis adı verilmektedir (Ellialtıoğlu ve ark., 2001).



Şekil 2.1. Anter kültürünün yapılışı (a) direkt *in vitro* androgenesis, (b) dolaylı *in vitro* androgenesis (Dayan, 2011)

Androgenesisi teşvik eden mekanizma hakkında fazla bilgi bulunmamakla birlikte anter kültüründen elde edilen haploid bitki sayısı üzerinde etkisi bulunan faktörlerle ilgili çok sayıda çalışma vardır. Anter kültüründen elde edilecek başarıyı etkileyen faktörlerin bir bölümü donör bitkiden kaynaklanmakta iken (genotip, donör bitkinin yetişme koşulları) bir bölümü de anter kültürü tekniğinin uygulanması sırasındaki koşullarla (anterlerin gelişme dönemi, anterlere yapılan ön uygulamalar, besin ortamının bileşimi ve yapısı, inkübasyon ortamı) ilgilidir. Bu etkenleri kısaca aşağıdaki gibi inceleyebiliriz.

Genotip: Genotip, anter kültürünün başarısını belirleyen en temel etkenlerdendir. Türler arasında, kallus veya embriyoid rejenerasyonu 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).

Haploid bitki vermesi istenen genotipten yüksek düzeyde androgenik yanıt alabilmek için başvurulacak iki yol vardır. Bunlardan birincisi her genotip için kültür koşullarını optimize etmektir. İkincisi ise anter kültüründe embriyo elde etme başarısı

yüksek genotipler ile düşük olanları melezleyerek, melez döllerden az veya çok embriyo elde etmeyi sağlamaktır (Ellialtıoğlu ve ark., 2001).

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).

Çeliktaş ve Hatipoğlu (1997) tarafından arpa üzerine yapılan bir çalışmada kültüre alınan 14.400 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.

Özü (2006), ekmeklik buğday anter kültüründe genotip, donör bitki yetiştirme koşulları ve anter kültür sıcaklığının haploid bitki rejenerasyonu üzerine etkisini saptamak amacı ile, tarla veya sera koşullarında yetiştirilen üç farklı ekmeklik buğday genotipinden (Seri 82, Genç 99, Balatilla) alınan anterleri P_2 ortamında dört farklı sıcaklıkta (25ºC, 27ºC, 30ºC, 32ºC) kültüre almıştır. Araştırma sonuçları, donör bitki yetiştirme koşullarının anter reaksiyon oranında istatistiksel olarak önemli bir farklılık yaratmadığını, genotip ve anter kültür sıcaklığının anter reaksiyon oranında istatistiksel olarak önemli farklılık yarattığını göstermiştir. Anter reaksiyon oranı ortalaması genotiplere bağlı olarak %0.4 ile %2.4 arasında değişmiş ve Seri 82 çeşidi incelenen diğer iki çeşide göre daha yüksek anter reaksiyon oranı ortalaması göstermiştir. Kültür sıcaklığının 25ºC'den 30ºC'ye kadar artırılması anter reaksiyon oranında artışa neden olmuş ve 30ºC'de kültür edilen anterler 25ºC'de kültür edilen anterlere göre istatistiksel olarak daha yüksek anter reaksiyon oranı ortalaması göstermişlerdir. 32ºC'de kültür edilen anterler 30ºC'de kültür edilen anterlere göre istatistiksel olarak önemli derecede daha düşük reaksiyon oranı ortalaması göstermişlerdir. Donör bitkilerin yetişme koşulları ve anter kültür sıcaklığı bitki rejenerasyon oranı, yeşil bitki rejenerasyon oranı ve albino rejenerasyon oranını istatistiksel olarak önemli derecede etkilememiştir. Bitki rejenerasyon oranı, yeşil bitki rejenerasyon oranı ve albino bitki rejenerasyon oranı genotiplere bağlı olarak önemli derecede farklılık göstermiş ve Seri 82 çeşidinin söz konusu özellikler açısından incelenen diğer iki çeşide göre daha üstün olduğu ortaya çıkmıştır. Araştırmadan elde edilen bulgulara dayanarak, ekmeklik buğday anter kültüründe, haploid bitki rejenerasyonunu etkileyen en önemli faktörün genotip olduğu sonucuna varılmıştır.

Donör bitkinin yetişme koşulları ve fizyolojik durumu: Donör bitkinin genotipi uygun dahi olsa anter kültüründe başarılı olabilmek için bu bitkilerin uygun koşullarda yetişmiş olması gerekmektedir. Uygun koşullardan kasıt, bitkinin yetiştiği dönemdeki sıcaklık, ışık yoğunluğu ve günlük ışıklanma süresi, havadaki CO_2 konsantrasyonu, bitkinin beslenme koşulları gibi çevresel faktörlerin optimum düzeylerde olmasıdır (Ellialtıoğlu ve ark., 2001).

Aynı tür hatta çeşitler ile yapılan çalışmalarda değişik sonuçlar alınması yetişme koşullarının etkisini gözler önüne sermektedir. Dumas de Vaulx ve Chambonnet (1982) "Dourga" adlı bir patlıcan çeşidinin anter kültüründe yüksek oranda haploid embriyo oluşturduğunu bildirdiği halde Tuberosa ve ark., (1987) ile Rotino ve ark., (1987) yaptıkları anter kültürü çalışmasında aynı çeşidin embriyo oluşturma yeteneği açısından düşük bir başarıya sahip olduğunu ileri sürmüşlerdir. Karakullukçu (1991)'nun çalışmasında ise aynı çeşit hiç embriyo oluşturmamıştır.

Hatipoğlu (1999), donör bitkilerin anterlerin alındığı döneme kadar çok iyi beslenmesi ve optimum ışık koşullarında muhafaza edilmesi gerektiğini ve suni ışığın güneş ışığının yerini alamayacağını belirtmiştir. Ayrıca polen gelişimi sırasında donör bitkilerin herhangi bir strese maruz kalmamaları ve anterlerin alınmasından 3-4 hafta öncesinden itibaren pestisit uygulamasından kaçınılması gerektiği kaydedilmiştir.

Ellialtıoğlu ve ark. (2001)'e göre genel olarak normal yetişme sezonunda ve açıkta yetiştirilen bitkilerin, yetişme dönemi dışında, serada veya iklim odasında yetişen bitkilere oranla anter kültüründe başarı şanslarının yüksek olduğu düşünülmektedir.

Genelde arazide yetiştirilen bitkilerin, büyüme odası veya serada yetiştirilenlere göre daha iyi donör bitkiler oldukları belirtilmiştir. 20000 lüx altında yetişen bitkilerden alınan anterlerin tepkisi, daha düşük ışık intensitesi altında büyüyen bitkilerden daha yüksektir (Gürel ve ark., 1992).

Froughi-Wehr ve Mix (1979), arpa anterlerinde kallus indüksiyonunun donör bitkilerin yetiştirildiği çevre şartlarından etkilendiğini, donör bitkilerin ilkbahar ve yaz aylarında açık arazide yetiştirilmesi durumunda gerek kallus üretimi, gerekse takip eden safhada rejenerant bitki oranının, sonbahar-kış aylarında serada yetiştirmeye oranla daha yüksek olduğunu, serada 18000-20000 lüx ışık şiddetinde yetiştirilen bitkilerin anterleri %0.3-3.2 arasında reaksiyon gösterirken, 8000-10000 lüx ışık şiddetinde yetiştirilen donör bitki anterlerinden %0-0.8 arasında reaksiyon elde edilebildiğini, bu nedenle birinci uygulamanın daha avantajlı bir yetiştirme sistemi olduğunu, ayrıca en

yüksek reaksiyonun donör bitkiler gündüz 12°C, gece ise 5°C sabit sıcaklıkta yetiştirildiğinde elde edildiğini saptamışlardır.

Farklı arpa çeşitleri kullanılarak yapılan bir araştırmada arazide yetiştirilen donör bitkiden alınan anterlerden meydana gelen ortalama yeşil rejenerantların oranı % 22.80, iklim odalarında yetiştirilen donör bitkilerden alınan anterlerin oluşturduğu yeşil rejenerantların oranı ise %14.30 olmuştur (Knudsen ve ark., 1989).

Doğramacı-Altuntepe ve ark. (2001), buğdayda donör bitkilerin yetişme şartlarının anter kültürüne etkilerini araştırmışlardır. Serada ve tarlada yetişen bitkilerin iklim odasında yetişenlere göre önemli derecede iyi sonuç verdiğini, tarlada yetişen materyalin ise serada yetişenlerden daha iyi sonuç verdiğini bildirmişlerdir. Yeşil bitki rejenerasyonunun tarlada ve serada yetişen materyalden elde edildiğini, ancak farkın önemli olmadığını; her iki ortamda yetişen materyalden albino bitkilerin de oluştuğunu; ancak iklim dolabında yetişen materyalden anter reaksiyonu alınmasına rağmen, albino veya yeşil bitki rejenerasyonu gerçekleşmediğini ifade etmişlerdir.

Jacquard ve ark., (2006) tarafından yapılan çalışmada, arpada donör bitkilerin yıllık döngüsü ve anter/başak pozisyonunun anter kültüründe bitki eldesi ve albinizm üzerine etkileri tespit edilmiştir. Çalışmada anter kültürüne tepkileri benzer fakat yeşil bitki oluşumu sırasıyla %78 ve %2 olarak bilinen "Igri" kışlık çeşidi ve "Cork" yazlık çeşidi kullanılmıştır. Her iki çeşitte de Şubat ve Temmuz ayları arasında alınan anterlerde Ağustos ve Aralık aylarında alınanlardan daha fazla sayıda rejenerant bitki elde edilmiştir. Bununla birlikte albino bitki oluşumu oranı etkilenmemiştir. Anterlerin ana başaktan ya da 4. kardeşten alınmasına göre çeşitlerin anter kültürüne tepkisi değişiklik göstermiştir. "Igri" çeşidinde %76.6' dan %31.5'e, "Cork" çeşidinde % 58'den %32'ye düştüğü kaydedilmiş böylece anter kültürüne tepkide genotipin etkiside gözlemlenmiştir.

Anterlerin gelişme dönemi: Androgenesisi etkileyen faktörlerin en önemlilerinden birisi mikrosporların gelişim safhasıdır. Uygun gelişim safhasındaki mikrosporlar kültüre alınmadıkça, diğer kültür şartları optimum olsa dahi polen embriyogenesisi gerçekleşmeyecektir. Bitki genotipleri arasında ve içinde çok değişkenlik olmakla birlikte en yüksek anter tepkisi, polen tanesinin tek çekirdekli olduğu dönemde elde edilmiştir. Bu safha çok kısa bir zaman periyodunu kapsar ve mayoz bölünme sonucu oluşan tetrat ile başlar ve ilk polen mitozu ile biter.

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).

Anterlere kültür öncesi uygulanan ön işlemler: Polen embriyogenesisinin başlatılabilmesi için farklı türlerde birçok temel mekanizma ortaya konmuştur. Yapılan çalışmalara göre bunlar arasından stres uygulamaları, embriyogenesisi başlatmada tetikleyici bir faktör olarak görülmektedir (Touraev ve ark., 1997).

Cistue ve ark. (1999) tarafından, arpa anter kültüründe, stres uygulamalarının gametofik gelişmeyi engellediği ve mikrosporlarda polen embriyogenesisini tetiklemek için gerekli olduğu ileri sürülmüştür.

Anter kültüründe, etkili stres uygulamalarından 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 uygulamaya 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 araştırıcılar tarafından bildirilmiştir (Fang ve Liang, 1985; Xie ve ark., 1997; Kiviharju ve Pehu, 1998).

Arpa (*Hordeum vulgare* L.)'da genotip ve soğuk ön uygulamalarının anter kültürü üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada; ticari 8 arpa çeşidi kullanılmıştır. Başaklar, karanlıkta 4°C'de 0, 7, 14, 21 ve 28 gün ön uygulamaya tabi tutulmuştur. Sonuçlar değerlendirildiğinde, tüm genotiplerde optimum ön uygulama süresi 21 gün olarak tespit edilmiştir. Genotipler arasında, anter kültürüne en fazla tepki veren "Igri" çeşidi olmuştur. Ön uygulamanın en fazla etkisi ise 'Heriot' çeşidinde gözlemlenmiştir. Bu çeşidin, uygulamaya tabi tutulmamışlar anterlerinde %3 tepki var iken, 14 gün ön uygulamaya tabi tutulmuş anterlerinde %52 tepki kaydedilmiştir (Powell, 1988).

Szarejko ve Kasha (1991) tarafından farklı arpa hat ve çeşitleri kullanılarak yapılan diğer bir çalışmada, anterlere 0, 7, 14, 21 ve 28 gün sürelerle +4°C'de soğuk ön

uygulama yapılmıştır. Genotiplere göre ön uygulama süresinin değiştiği, ancak tepki gösteren anter oranı yönünden 14 günlük sürenin uygun olduğu bildirilmiştir.

Lezin ve ark. (1996), farklı arpa genotiplerini kullanarak yaptıkları bir çalışmada, +4°C'de 14 günlük soğuk uygulamasının anterlerde kallus oluşumunu ve buna bağlı olarak yeşil bitki rejenerasyonunu arttırdığını saptamışlardır.

Roberts-Oehlschlager ve Dunwell (1990) Igri arpa çeşidinde farklı ön uygulamaların etkilerini araştırdıkları çalışmada, 0.3 M manitol içeren ortamda, 25°C'de, 4 gün boyunca ön uygulamaya tabi tutulan anterlerin, 14 gün buyunca 4°C 'de soğuk ön uygulamaya tabi tutulan anterlere oranla daha iyi yanıt verdiğini bildirmişlerdir. Ön uygulama geçiren anterleri sonrasında ise maltoz içeren ortama transfer etmişler, mikrospor bölünmesinin ve yeşil bitki rejenerasyonunun arttığını ifade etmişlerdir.

Cistue ve ark. (1994) arpa anter kültürüne farklı ön uygulamaların etkilerini araştırdıkları çalışmada, 0.7 M manitol içeren ve 8 g/l agar ile katılaştırılan ortamda ön uygulamaya tabi tuttukları anterlerde, bölünen mikrospor sayısının ve yeşil bitki rejenerasyonun albino bitki rejenerasyonuna oranla arttığını belirtmişlerdir.

Cistué ve ark. (1999) tarafından, model (Igri çeşidi) ve düşük tepki veren çeşitlerde, anter ön uygulaması ve kültür ortamı içeriğinin yeşil double haploid bitki üretimi üzerine etkilerinin belirlendiği bir çalışmada; manitol ön uygulamasının bazı düşük tepki veren çeşitler için soğuk ön uygulamasından daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Ön uygulama için manitolün optimum konsantrasyonunun çeşide bağlı olarak değiştiği ve düşük tepki veren genotipin, iyi tepki verene göre daha fazla manitol içeriğine ihtiyaç duyduğu belirlenmiştir. Sıvı besin ortamına ficoll ilavesi ile embriyo ve yeşil bitki oluşumunun arttığı tespit edilmiştir. Büyüme düzenleyicilerden, 2,4-D (2,4-diklorofenoksiasetikasit) ve TIBA (2,3,5-triiyodobenzoikasit)'nın etkileri denenmiştir ve antioksin olan TIBA'nın düşük tepkili bazı çeşitlerde iyi embriyo oluşumu sağladığı kaydedilmiştir. İki sıralı çeşitlerden, altı sıralı olanlara göre daima daha fazla embriyo ve yeşil bitki oluştuğu tespit edilmiştir.

Kruczkowska ve ark. (2002), biri androgenetik potansiyeli yüksek Igri çeşidi olmak üzere 3 arpa çeşidinde 3 farklı ön uygulama yönteminin anter kültürüne etkilerini araştırmışlardır. Ön uygulama yöntemleri sırasıyla *ı*) 4°C'de, 28 gün *ıı*) 0.3 M manitol içeren ortamda, 25°C'de, 4 gün *ııı*) 0.3 M manitol içeren ortamda 4°C'de, 4 gün şeklindedir. Araştırma sonuçları değerlendirildiğinde, soğuk ön uygulama yönteminin (ı) embriyoid/kallus oluşum oranını artırdığı, manitol ön uygulaması yönteminin (ıı) ise,

yeşil rejenerant bitki sayısını artırdığı gözlemlenmiştir. Manitol+soğuk ön uygulama (ıı) yöntemi ise etkisiz kalmıştır.

Besin ortamının bileşimi ve yapısal özellikleri: Normal bir mikrospor polen olma yolunda sadece 2 mitotik bölünme geçirirken, androgenik mikrosporlarda tekrarlanan bölünmeler söz konusudur. Bu nedenle, ilave bölünmeleri teşvik etmek için besin ortamına eklenen çok sayıdaki bileşen ve bunların miktarı büyük önem taşımaktadır. Besin ortamındaki karbonhidrat ve nitrojen kaynakları ve bunların konsantrasyonları, büyüme düzenleyiciler, katılaştırıcı maddenin tipi yanında ortamın tipi (katı, sıvı veya 2 fazlı) ve pH'sı, üzerinde önemle durulması gereken konulardır.

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).

Anter kültürü çalışmalarının büyük çoğunluğunda kültür ortamlarına ilave edilen hormonların, anterlerden embriyo oluşumunu teşvik ettiği bilinmektedir. Hormonların bu etkisi; anterlerin içerisinde bulunan mikrosporların gametofitik safhadan sporofitik safhaya yönlendirilmeleri seklinde gelişmektedir. Anter kültürünün ilk çalışılmaya başlandığı yıllarda embriyo uyartımı için ortamlara sadece oksin ilave edilirken, zamanla 'inatçı' türlerde yapılan çalışmaların olumsuz sonuçları, araştırmacıları oksinlerle beraber sitokinin kullanımına yöneltmiştir. Çünkü hücresel farklılaşma birçok yönden bu iki grup büyüme düzenleyiciler arasındaki interaksiyonla kontrol edilmektedir. Nitekim George (1996)'nin da bildirdiğine göre embriyogenesis başlangıcı için oksinlere ilave olarak sitokinin kullanımı da gerekmektedir.

Besin ortamına 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).

Daha önceki çalışmalarda, sakkaroz en çok kullanılan karbon kaynağı olmasına rağmen, son zamanlarda araştırıcılar 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.

Kültürde kullanılan besin 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.

Besin ortamının pH seviyesi *in vitro* da 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 *in vitro* 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 araştırıcılar tarafından ileri sürülmüştür (Stamp ve Meredith, 1988; Altamura ve ark., 1992; Salunkhe ve ark., 1999).

Cai ve ark., (1992) tarafından yazlık arpa genotipleri kullanılarak yapılan çalışmada, indüksiyon ortamında karbon kaynağı ve büyüme düzenleyici kompozisyonunun etkisinin anter kültürüne tepkileri araştırılmıştır. Anterler ficoll içeren maltoz, sakkaroz (%6, a/h) karbonhidratlarından birinin ilave edilmiş olduğu BAC3 (Szarejko ve Kasha, 1991) ortamında kültüre alınmışlardır. Maltoz içeren ortamlarda sakkaroz içeren ortamlara oranla, tepki veren anter sayısında, kallus ya da embriyoid üretiminde ve yeşil bitki rejenerasyonunda önemli bir şekilde artış gözlenmiştir. Büyüme düzenleyicileri arasında test uygulandığında, oksin NAA (naftalenasetikasit) (2 mg/l) ve sitokinin BAP (6-benzilaminopürin) (1 mg/l) kombinasyonu, oksin 2.4-D ve sitokinin BAP ya da Zeatin riboside kombinasyonundan daha iyi sonuç vermiştir.

Lazaridou ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada farklı arpa çeşit, melez ve populasyonlarının anter kültüründe, 4°C'de 14 ve 28 gün süre boyunca soğuk ön uygulamadan sonra iki farklı katı başlangıç ortamında, embriyoid oluşturma frekansı ve bitki rejenerasyonunu araştırmışlardır. İçerik ve enerji kaynağı bakımından (FHG'de

maltoz, N6'da sakkaroz) birbirinden farklı olan N6 (Chu, 1978) ve FHG (Hunter, 1987) besin ortamları kullanılmıştır. Embriyoid sıklığı ve yeşil bitki rejenerasyonu her iki ortamın içeriklerine ve soğuk ön uygulamaya bağlı olarak değişiklik göstermiştir. 28 gün soğuk ön uygulama ile FHG ortamının kombinasyonu haploid embriyo oluşma ve yeşil bitki üretiminde en etkili sonuç vermiştir. Ayrıca, yeşil bitki üretimi genotipe bağlı olarakta değişmektedir. Çalışılan genotiplerden, Thermi çeşidi ve Niki x Thermi F_1 melezinde en yüksek frekansta yeşil bitki üretimi oluşmuştur. Anter kültüründe embriyoid oluşumu yüksek ya da orta frekanslı olan ebeveyn, F_1 melez ya da F_2 generasyonunda yeşil bitki üretiminin etkinliğinin artmasına yol açmaktadır.

Savaşkan ve ark. (1999), anter kültürü tekniğinin dört arpa çeşidine (*Hordeum vulgare* L. var. Anadolu, Cumhuriyet-50, Obruk-86 ve Tokak-157/37) uygunluğunu araştırmışlardır. BAC3 ve FHG kültür ortamları kullanılmış ve 21 gün soğuk ön uygulamanın etkisi araştırılmıştır. Anter kültürü için kullanılan başaklar, mikrosporlar tek çekirdekli safhadayken toplanmış, 21 günlük soğuk ön uygulamadan sonra %2'lik asetokarmin ile kontrol edildikten sonra anterler kültür ortamlarına alınmış ve 27 ± 1ºC sıcaklık ve karanlıkta inkübasyona alınmıştır. BAC3 ortamı FHG ortamından daha iyi sonuç vermiştir. BAC3 ortamında, 21 gün soğuk ön uygulamadan sonra Tokak ve Cumhuriyet çeşitlerinde kallus üretimi sırasıyla % 97.6 ve % 75.3 olarak bulunmuştur. Anadolu ve Obruk çeşitlerinde ise bu oran % 40.4 ve % 34.5 olarak bulunmuştur. BAC3 ortamında bütün çeşitlerde bitki rejenerasyonu meydana gelmiştir ve en yüksek yeşil bitki üretimi Cumhuriyet-50 çeşidinde görülmüştür.

Aminoasit karışımı ve bitki büyüme düzenleyicileri FGH anter kültürü ortamına ilave edilip etkileri 3 arpa çeşidinde ("Cadette", "Leger", "Igri") ve 2 farklı büyütme ortamında (büyütme kabini ve sera) denenmiştir. "Leger" ve "Igri" çeşitleri androgenesise olumlu "Cadette" çeşidi inatçı olarak bilinmektedir. İlk deneme sonucunda aminoasit ilave edilmiş ortam embriyo oluşumu ve rejenerasyonunda "Leger" çeşidinde sadece büyütme kabininde en iyi ortam olarak kaydedilirken "Cadette" ve "Igri" çeşitlerinde her iki büyütme ortamında da en iyi sonucun alındığı ortam olarak belirtilmiştir. ABA (absisik asit) ve TDZ (thidiazuron) ilavesinin embriyo oluşumu ve bitki rejenerasyonunu etkilemediği, PAA (fenilasetikasit) ilavesinin büyütme kabininde embriyo oluşumunu ve rejenerasyonunu azalttığı tespit edilmiştir. FGH ortamına aminoasit ilavesi ile büyütme kabininde albino bitkilerin yüzdesinin azaldığı belirlenirken büyüme düzenleyicileri ilavesinin albino bitki oluşumu etkilemediği hatta bazı uygulamalarda arttırdığı kaydedilmiştir. Büyütme kabininde

ortam göz ardı edildiğinde “Leger” çeşidininde “Cadette” ve “Igri” çeşitlerinden daha fazla embriyo üretildiği, “Leger” ve “Igri” çeşitlerinde “Cadette” çeşidinden daha fazla yeşil bitki elde edildiği belirlenmiştir. Albino bitkilerin yüzdesi “Cadette” çeşidinde diğer çeşitlere oranla daha yüksek bulunmuştur. 2. Denemede 8 hibrit çeşit ve onların ebeveynleri adrogenik uyumluluk için karşılaştırılmıştır. Melezlerin yeşil bitki üretme yeteneğinin her ebeveynin beklenen ortalama katkısından fazla olduğu kaydedilmiştir (Ouédraogo ve ark., 1998).

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 (Çeliktaş ve Hatipoğlu, 1997).

Olsen (1987) tarafından, arpa anter kültürüne besin ortamı içeriğinin etkisi araştırılmıştır. Ficoll içeren sıvı arpa anter kültürü ortamında amonyum nitrat içeriği artırılmış ve azot kaynağı olarak glutamin kullanılmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde, bu ortamda mikrosporlardan direk embriyoidler gelişmiş ve bu embriyoidlerden gelişen yeşil rejenerant bitki sayısı da artmıştır. Besin ortamında amonyum nitrat miktarının artırılması ve glutamininin varlığı kültür gelişimi için yararlı olmuştur.

Luckett ve Smithard (1995) anter kültüründe besin ortamı içeriğinin etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, farklı araştırmacılar tarafından arpa anter kültürü için geliştirilmiş farklı besin ortamlarını kullanmışlardır. Bu ortamlar; FHG (Hunter, 1987), K&FW (Kuhlman ve Foroughi-Wehr, 1989), BAC3 (Szarejko ve Kasha, 1991), Kao (Kao, 1991) olup, biri anter kültürü için model çeşit olan Igri olmak üzere toplam üç çeşitte çalışmışlardır. Araştırma sonuçları değerlendirildiğinde ise, sonuçlar genotipe bağlı olarak değişiklik göstermiştir. Çeşidin birinde en yüksek embriyoid ve rejenerant bitki oluşumunu sağlayan bir ortam diğer çeşitte etkisiz olmuş hiçbir sonuç alınamamıştır. Genotipe göre besin ortam içeriğinin optimize edilmesi gerektiğini belirtmişlerdir.

İnkübasyon koşulları: Anter kültürlerinin inkübe edildiği ortamın, ışık tipi ve değeri ile sıcaklığı kallus veya embriyo oluşumu üzerinde büyük öneme sahiptir. Tahıllarda anter kültürü için ortam sıcaklığı 20-26°C arasında değişim göstermektedir. Genellikle karanlık ortam, aydınlık ortamdan daha etkili bulunmuştur. Ayrıca fotoperiyot ve ışık intensitesi araştırıcılara göre değişiklik gösterebilmektedir (Jing ve Hu, 1987; Li ve ark., 1991).

Anter kültürü metotlarıyla arpa mikrosporlarından yeşil bitki elde edilmesi için kültür şartlarının araştırıldığı bir çalışmada; kallus ya da embriyoid oluşumunda en yüksek oran, anterlerin karanlıkta 2,4-D yada Kin (kinetin) içeren yüksek ficoll ortamında kültüre alınmasıyla elde edildiği bildirilmiştir. Oluşan embriyoidler ve kalluslar IBA (indol-3bütirikasit) ve Kin içeren yüksek Ficoll-yüksek şeker ortamda düşük ışıkta kültüre alınmıştır. Son olarak embriyolar agar içeren katı ortama aktarılmıştır. Tek bir anterin mikrosporlarından en fazla 13 yeşil bitki elde edilmiştir. Elde edilen yeşil ve albino bitkilerin oranının, kültür şartlarına bağlı olarak 9:1 ila 1:9 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Anaerobik koşullar altında, laktik asit ve diğer organik asitlerin, hücre içerisinde organellere zarar verebildiği ve bunun sonucunda albino bitkilerin oluşabileceği bildirilmiştir. Bu nedenle, anter kültürü metoduyla mikrosporlardan yeşil bitkiler eldesinde yüksek frekans elde etmek için uygun kültür koşullarının ve yüksek Ficoll-yüksek şeker ortamının gerekli olduğu kaydedilmiştir (Kao ve ark., 1991).

2.2. Embriyo Kültürü Tekniği

Etkili bir doku kültürü sisteminin kurulması monokotiledonlarda, özellikle *Gramineae* familyasında, dikotiledonlara oranla daha zor olmasına karşın (Hanzel ve ark., 1984; Özgen ve ark., 1996; Shah ve ark., 2003) son yıllarda geliştirilen doku kültürü teknikleriyle, kültür bitkilerinin özelliklerinin değiştirilmesinde ve geliştirilmesinde ilerlemeler sağlanmıştır.

Arpada, kallus oluşumu ve bitki rejenerasyon etkinliğinin, çeşitli araştırmacılar tarafından, genotipe (Lührs ve Lörz, 1987; Popelka ve Altpeter, 2001), donör bitkinin kalitesine (Maes ve ark., 1996; Dahleen, 1999), explantın gelişme dönemine (Thomas ve Scott, 1985; Maes ve ark., 1996) ve kültür ortamının içeriğine (Lührs ve Lörz, 1987; Barro ve ark., 1999; Dahleen ve Bregitzer, 2002) bağlı olduğu belirlenmiştir.

Arpada, bitki rejenerasyon protokolleri, büyük oranda genotipe bağlılık (Tanguchi ve ark., 1991; Akula ve ark., 1999; Ganeshan ve ark., 2003) ve düşük rejenerasyon kapasitesi (Rengel, 1987; Bregitzer ve ark., 1998) nedeniyle etkili ve geniş bir şekilde kullanılamamaktadır. Bu yüzden biyoteknolojik uygulamalar, düşük agronomik değere sahip ancak doku kültürü kapasitesi yüksek, model bitkiler olarak adlandırılan birkaç arpa çeşidinde sınırlı kalmaktadır. Hem doku kültürü potansiyeli hem de agronomik özellikleri yüksek, seçkin arpa genotiplerinde de kallus uyarımı ve

bitki rejenerasyon protokollerinin araştırılması ve kurulması gerekmektedir (Han ve ark., 2011).

Lührs ve Lörz (1987) yaptıkları çalışmada, farklı besin ortamlarında 41 arpa hattının olgunlaşmamış embriyolarını kültüre almışlar ve kallus uyarımı ile somatik embriyogenesis araştırmışlardır. Modifiye edilmiş MS (Murashige ve Shoog, 1962) ve CC (Potrykus ve ark., 1979) besin ortamları embriyogenik kallus oluşum oranı açısından en yüksek sonucu vermiştir. Embriyogenik kallus oluşumu için 2.4-D, dikamba (2,4-diklorofenoksiasetikasit), pikloram (4-amino-3,5,6-trikloropikolinikasit) ve 2.4.5-T (2.4.5-triklorofenoksi-asetikasit) oksinlerinin uygun olduğunu belirlemişlerdir. 23 arpa hattında, embriyogenik kallus ve rejenerant bitki elde etmişler, genotipin embriyogenik kallus oluşum oranını etkileyen en önemli faktör olduğunu belirlemişlerdir. Rejenerasyon kapasitesi yüksek, Golden promise çeşidi en iyi sonucu vermiştir.

15 arpa genotipinin olgunlaşmamış embriyoları kültüre alınmıştır. Genotip, besin ortamı ve genotip x besin ortamı interaksiyonlarının embriyonik kallus oluşum oranını, embriyonik kallusun morfolojisi ile büyüme oranını ve rejenerasyon kapasitesini etkilediği belirtilmiştir. Genotipin ise en baskın faktör olduğu bildirilmiştir (Bregitzer, 1992).

Akula ve ark. (1999) yaptıkları çalışmada, dokuz arpa çeşidinde olgun embriyodan bitki rejenerasyon protokolünü araştırmışlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre kallus oluşumu ve rejenerasyon kapasitesinin büyük oranda genotipe bağlı olduğunu belirtmişlerdir.

İspanya'da yetiştirilen 18'i iki sıralı, 14'ü altı sıralı olmak üzere toplam 32 arpa çeşidi, olgunlaşmamış embriyoları kullanılarak bitki rejenerasyonu için kültüre alınmıştır. Çeşitler arasında rejenerasyon kapasitesi açısından çok fazla varyasyon olmasına rağmen, 'Almunia' hariç diğer tüm çeşitlerden bitki elde edilmiştir. İki ve altı sıralı tipler arasında, rejenerasyon yüzdesi açısından istatistiksel farklılık elde edilmemiştir. Kültüre alma işleminden 3-4 ay sonra, Cobra, Hop ve Reinette çeşitlerinde, oksinlerin (2.4-D, Pikloram, Dikamba) embriyogenesis uyarımı ve rejenerasyon kapasitesi üzerine etkileri değerlendirilmiştir. En iyi sonuç, çeşitler arasında Hop çeşidinde elde edilirken, oksinler arasında ise dikamba içeren besin ortamında elde edilmiştir. Büyüme düzenleyicileri ile mikro element kompozisyonları farklı olan 5 rejenerasyon ortamı denenmiştir.10 µM bakır sülfat içeren rejenerasyon ortamı en iyi sonucu vermiştir. Bu ortamda kültüre alınan Hop çeşidinin rejenerasyon

sıklığı %59.5'den %93.7'e yükselmiştir. Sonuç olarak, kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonunda besin ortamı içeriği ve genotipin etkili olduğu bildirilmiştir (Castillo ve ark., 1998).

Pek çok arpa çeşidinde, bitki rejenerasyon sistemindeki genotipik sınırlamalar genetik transformasyon çalışmalarını engellemektedir. Ticari çeşitlerin rejenerasyon protokollerinin optimizasyonu onların genetik transformasyon çalışmalarına olan ilgiliyi de artırmaktadır. Bregitzer ve ark. (1998) yaptıkları çalışmada, ticari açıdan önemli 3 farklı arpa çeşidinde olgunlaşmamış embriyoları kültüre almışlardır. Farklı konsantranyonlarda 2.4-D ve bakır sülfat'ın, kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonuna etkilerini araştırmışlar ve sonuç olarak 3 genotipte de farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışma genotipe bağlı rejenerasyon protokollerinin geliştirilmesini ve kullanılmasını önermektedir. Böylece ticari arpa çeşitlerinde genetik transformasyon çalışmalarının kolaylaşacağı beklenilmektedir.

Özgen ve ark. (2004) yaptıkları çalışmada, Icarda-68, Icarda-69, Tokak-157/37, Kavak, Ankara-86, Line-506 ile bu ebeveynlerin F_1 melezleri olmak üzere toplam 15 genotip de olgun embriyo kültürü aracılığıyla, melez gücünün kallus uyarımına, kallus ağırlığına, kallusların rejenerasyon kapasitelerine ve rejenerant bitki sayısına etkisini araştırmışlardır. 33°C'de, 2 saat boyunca beklettikleri tohumlardan embriyoları izole edip, kalkancıkları (scutellum) yukarı gelecek şekilde 3 mg/l 2.4-D içeren MS besin ortamında kültüre almışlardır. Oluşan kallusları, sürgün ve kök gelişimi için hormonsuz MS besin ortamına almışlar, elde ettikleri rejenerant bitkileri yeterli olgunluğa gelince toprağa aktarmışlardır. İstatistiki sonuçlar değerlendirildiğinde, melez gücünün pozitif etkisi kallus ağırlığı dışındaki tüm karakterlerde fark edilmiştir.

Önemli agronomik özellikleri olan 23 yazlık arpa çeşidinin olgunlaşmamış embriyoları, 2.4-D ve dikamba içeren modifiye edilmiş ortamlarda kallus teşviki ve rejenerasyon için kültüre alınmıştır. Genotipe göre % 88 ve %100 aralığında kallus oluşumu elde edilmiştir. Büyüme düzenleyicilerinden dikamba, kallus oluşumu ve rejenerasyon sıklığı açısından 2.4-D'ye kıyasla daha uygun bulunmuştur. Tüm çeşitlerde yeşil rejenerant bitkiler elde edilmiştir. Albino bitki oluşmamıştır. Çalışmada kullanılan tüm çeşitler model çeşit olan Golden promise'den düşük rejenerasyon kapasitesi göstermişlerdir (Halamkova ve Ohnoutkova, 2004)

Han ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada, model çeşit Golden promise ve yüksek agronomik özelliklere sahip 11 arpa çeşidinin olgun embriyolarını kültüre almışlardır. Tamamı 0.5 g/l proline ve 0.5 g/l kazein hidrozilat içeren MS, B5 (Gamborg ve ark.,

1968) ve N6 ortamlarının makro, mikro elementleri ve vitaminleriyle modifiye edilmiş, dokuz farklı besin ortamı arasından optimum ortam belirlenmiştir. Genotipler arasında, belirlenen optimum ortamda, kallus oluşum frekansı açısından %17.9 ila %78.4 arasında farklılıklar olmuştur. Oluşan kalluslardan yeşil bitkilerin eldesi, biri Golden promise olmak toplam 3 çeşitte gerçekleşmiştir. Bu genotipler arasında yeşil bitki oluşturma frekansı da %9.7 ila %21.0 arasında değişiklik göstermektedir. Bu araştırma göstermektedir ki; aynı kültür şartlarında farklı genotipler arasında büyük farklılıklar görülmektedir.

Birsin ve ark. (2001), 10 yulaf genotipini (Ankara–76, Ankara-84, A-803, A-804, A-805, A-821, A-822, A-823, A-824 ve A-825) olgun embriyolarını kallus oluşumu için 2 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında kültüre almışlardır. Rejenerasyon için hormonsuz MS ortamını kullanarak yaptıkları çalışmada en yüksek kallus oluşum oranının A–821 (%95) genotipinde, en düşük ise A–805 (%50) genotipinde meydana geldiğini bildirmişlerdir. Ayrıca en yüksek rejenerasyon kapasitesinin A–824 (%93) genotipinde, en düşük rejenerasyon kapasitesinin Ankara-76 (%69.3) genotipinde meydana geldiğini belirtmişlerdir. Sonuç olarak kallus oluşumunun ve bitki rejenerasyonun genotipe göre değiştiğini ve kallus oluşumu ve rejenerasyon kapasitesinin farklı genler tarafından idare edildiğini bildirmişlerdir.

Haliloğlu ve Baenziger (2005) yaptıkları çalışmada, 5 kışlık (Pronghorn, Alliance, 2137, NE92458 ve Culver) ve 2 yazlık (Bobwhite ve Fielder) buğday genotipinin olgunlaşmamış embriyolarını 3 farklı ortamda kültüre almışlardır. Kallus oluşum oranının %5,7–%100 arasında değiştiğini, en yüksek kallus oluşumunun Bobwhite (%100) genotipinde, en düşük kallus oluşumunun ise Alliance (%5,7) buğday genotipinde meydana geldiğini saptamışlardır. Bunun yanında kallus oluşumu ve somatik embriyo oluşumunda ortamın ve genotipin etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Özgen ve ark. (1996), 7 kışlık durum buğday genotipinde (Çakmak 79, Kırmızı 5132, S. Bursa 7113, Kunduru 414/44, Berkmen 469, T–104, T–105) olgunlaşmış ve olgunlaşmamış embriyoda yapmış oldukları çalışmada, olgunlaşmamış embriyoda en yüksek kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonun Kunduru 414/44 ve Kırmızı 5132 çeşitlerinde, olgunlaşmış embriyoda ise Berkmen 469 çeşidinde meydana geldiğini ve ayrıca her iki eksplant kültüründe de kallus oluşumu ve bitki rejenearsyonunda genotipin etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Yine Özgen ve ark. (1998), 12 kışlık buğday genotiplerinin (Gerek 79, haymana 79, Bezostaja 1, Bolal 2973, Başak 95, Sadova 1, Tosun 21, Yayla 305, Yektay 406,

Sivas 111/33, Kıraç 66, T-115) olgunlaşmış ve olgunlaşmamış embriyolarını kültüre almışlardır. Çalışma sonucunda olgunlaşmamış embriyo kültüründe en yüksek kallus oluşumu (%93.3) ve rejenerasyon kapasitesinin (%96.6) Yayla 305 çeşidinde, olgunlaşmış embriyoda ise en yüksek kallus oluşumu (%98.3) ve rejenerasyon kapasitesinin (%96.6) T-115 genotipinde meydana geldiğini bildirmişlerdir. Yine aynı çalışmada her iki embriyo kültüründe kallus oluşum oranı, kallus ağırlığı, rejenerasyon kapasitesi arasındaki korelasyonun önemsiz olduğunu, kallus oluşumu ve rejenerasyon kapasitesinin farklı genler tarafından idare edildiğini ve de kallus oluşum oranın ve bitki rejenerasyonun genotipe ve eksplant kaynağına bağlı olduğunu kaydetmişlerdir.

Omer ve ark. (2008) Sudan'dan 8 mısır saf hattını ve 3 açıkta tozlanan çeşitlerin doku kültürüne yanıtlarını değerlendirmişlerdir. Kallus oluşturmak için tozlanmadan 16 gün sonra oluşan olgunlaşmamış embriyoları eksplant olarak kullanmışlardır. Kallus gelişimi 2 mg/L 2,4- D içeren LS (Linsmaier ve Skoog, 1965) ortamında elde edilmiştir. Kallus oluşturma oranı en yüksek IL3, IL15 ve IL1 saf hatlarında tespit edilmiştir. Hudiba-1 ve Hudiba-2 genotiplerinin istatistiksel olarak birbirinden farklı olmadığı saptanmıştır. IL16, IL42, IL43 ve IL28 saf hatlarının ise en düşük embriyogenik kallus oluşum oranına sahip olduğu bulunmuştur. Bitki rejenerasyonu gösteren genotiplerin IL3, IL38, IL15, IL1, Hudiba 2 ve Mojtamaa-45 olduğu bildirilmiştir. IL3 saf hattı kallus basına ortalama 6 sürgünle ve % 76'lık sürgün oluşturma frekansıyla en iyi rejenere olabilen genotip olarak değerlendirilmiştir. En yüksek rejenerasyon gösteren çeşit ise kallus basına ortalama 5 sürgünle Mojtamaa-45 olduğu bildirilmiştir. Sonuç olarak mısırda kallus oluşumuna genotipin etkisinin önemli olduğu görülmektedir.

Binott ve ark. (2008) 20 ebeveyn kendilenmiş hattın ve bunların tekli melez hibritlerinin olgunlaşmamış mısır embriyolarını kullanarak kallus oluşumu, somatik embriyo oluşumu ve bitki rejenerasyonlarındaki yanıtlarını karşılaştırmışlardır. Hasattan 10 ile 24 gün arasında değişen fizyolojik aşamalarda tohumlar alınıp steril edilmiş ve embriyoları kesilmiştir. Bu embriyolar kallus oluşturmak üzere yarı katı N6 ortamına aktarılmıştır ve bu ortama 0-20 mg/l arasında değişen seviyelerde 2,4-D ilave edilmiştir. Bitki rejenerasyonu için büyüme düzenleyicisiz MS ortamı kullanılmıştır. Optimum ilk kallus oluşumu 2 mg/L 2,4-D'li ortamda hibritlerde ortalama % 83, saf hatlarda ise % 67 oranında bulunmuştur. Somatik embriyo oluşumu 6 saf hat ve 4 hibritte başarılmıştır. Bununla birlikte bitki rejenerasyonu sadece 4 saf hat ve 3 hibrit te başarılmıştır. Rejenere olan bitkilerin % 90'ı normal ve verimli bulunmuştur. Bazı saf hat ve hibritlerdeki bu rejenerasyon başarısı *Agrobacterium tumefaciens* ile genetik

transformasyonda tuzluluğa ve böceklere tolerans için bir özellik geliştirmede bir temel olduğunu ifade etmektedirler. Ve bu çalışmada, mısırda kallus oluşumu ve rejenerasyonunda genotipin etkisinin göstermektedir.

Gramineae familyasına ait türlerde, embriyogenik kallus teşviki ve bitki rejenerasyonunu etkileyen en önemli faktör genotip olmakla birlikte, kullanılan besin ortamlarının içeriği ve büyüme düzenleyicileri kombinasyonları da diğer önemli faktörlerdir (Castillo ve ark., 1998).

Kültür ortamına ilave edilen bitki büyüme düzenleyicilerinden hücre bölünmesini ve gelişimini uyarıcı etkiye sahip olan oksinler, kallus oluşumunu en fazla etkileyen bileşiklerdir. En fazla kullanılan oksin 2.4-D olmasına rağmen pikloram, dikamba ve 2.4.5-T gibi güçlü oksinler de alternatif olarak kullanılmaktadır. Kalluslardan bitki rejenerasyonu için ise BAP ve TDZ gibi sitokininler kullanılmaktadır.

Vitanova ve ark. (1995), arpada 2.4-D'nin bitki rejenerasyonu üzerine etkisini araştırmış, 10 mg/l 2.4-D'nin hem kallus oluşumu hem de bitki rejenerasyonu üzerine olumlu etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

Shan ve ark. (2000) yaptıkları araştırmada, TDZ kullanımının arpa (*Hordeum vulgare* L.) ve buğdayda (*Tritucum aestivum*) henüz olgunlaşmamış embriyolarda *in vitro* rejenerasyon üzerine etkisini araştırmışlardır. TDZ'nin rejenerasyonu artırdığını ve kallustan sürgün rejenerayonunu sağladığını tespit etmişlerdir. Buğdayda sürgün rejenerasyonu için en uygun TDZ seviyesi 0.9 µM (0.2 mg/l) olurken, arpa kallusundan sürgün rejenerasyonu 4.5 µM (1 mg/l) TDZ konsantrasyonunda en yüksek olmuştur. Elde edilen buğday ve arpa sürgünleri, TDZ içeren ortamdan köklendirme ortamına transfer edildiğinde kökler normal olarak gelişmişlerdir. Sonuç olarak arpa ve buğday *in vitro* rejenerasyonu için yaygın olarak kullanılan diğer büyüme düzenleyicilere göre TDZ'nin en iyiler arasında olduğu ifade edilmiştir.

Buğday, arpa, triticale üzerinde çalışan Przetakiewicz ve ark. (2003), olgunlaşmamış embriyoları MS tuzları + B5 vitamini + %3 sakkaroz içeren besi ortamında üç farklı oksin tipinin (2,4-D, dikamba, pikloram) 3 mg/l dozlarını ve kombinasyonlarını (1 mg/l pikloram + 1 mg/l 2.4-D; 1.5 mg/l pikloram + 1.5 mg/l dikamba; 1.5 mg/l pikloram +1.5 mg/2.4-D; 1.5 mg/l dikamba + 1.5 mg/l 2.4-D) kullanarak kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu üzerine etkisini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda uygun oksin tipinin ve dozunun genotipe göre değiştiğini saptamışlardır.

Serhantova ve ark. (2004), üç farklı oksin (dikamba, pikloram, 2.4-D) tipinin, kallus teşviki ve sonrasında rejenerasyon kapasitesine etkisini araştırmışlardır. Yüksek rejenerasyon yeteneği ile bilinen Golden promise çeşidi ve Çek Cumhuriyetine ait 12 yazlık arpa çeşidinde çalışmışlardır. Genotip ve oksin tipi, kallus oluşum oranını ve elde edilen yeşil rejenerant bitki sayısını büyük oranda etkilemiştir. Çalışılan çeşitlerin çoğunda, 2.4-D içeren ortamlar dikamba ve pikloram içeren ortamlarla kıyaslandığında, en yüksek ortalamada kallus teşviki ve sonrasında yeşil rejenerant bitki elde edilmiştir. Genotipler arasında ise, en yüksek yeşil rejenerant bitki sayısı (üç oksin tipinde), doku kültürü kapasitesi yüksek model bitki Golden promise çeşidinde elde edilmiştir. Çek Cumhuriyetine ait çeşitlerden ise üçünün rejenerasyon yeteneğinin yüksek olduğu belirlenmiş ve genetik transformasyon çalışmaları için uygun bulunmuştur.

Sharma ve ark. 2005, yaptıkları çalışmada Avrupa orijinli arpa çeşitlerinin olgun embriyolarını, MS tuz ve vitaminlerine ilaveten 1 g/l kazein hidrozilat, 0.5 mg/l proline, 0.2 mg/l *myo*-inositol, 1 mg/l thiamine ve 1.25 mg/l CuSO4.5H2O içeren modifiye edilmiş besin ortamında kültüre almışlardır. Kallus oluşumu için 2.4-D ve maltozun farklı konsantrasyonlarda kombinasyonlarını denerken, sürgün oluşumu içinse aynı ortamda 2.4-D ile düşük oranlarda BAP ve TDZ büyüme düzenleyicilerinin farklı kombinasyonlarını denemişlerdir. Kallus oluşum oranlarına bakıldığında, 6 mg/l 2.4-D ile %6 (a/h) maltoz içeren ortam en iyi sonucu vermiştir. Sürgün oluşum oranlarına bakıldığında ise, düşük orandaki BAP oldukça etkili bulunmuştur. Bu protokol, bitki rejenerasyonunun (olgun embriyoların izolasyonundan, toprağa transfer edilecek bitkilerin elde edilmesine kadar tüm aşamalar) 16-20 hafta içerisinde tamamlanmasını sağlamıştır. Tüm çeşitlerde %25 ile %55 arasında embriyogenik kalluslar elde edilmiş ve embriyogenik kallus başına elde edilen ortalama yeşil bitki sayısı genotipe bağlı olarak %1.5 ile %7.5 arasındadır.

TDZ ve/veya BAP büyüme düzenleyicilerini içeren modifiye edilmiş (MS tuzları+ B5 vitaminleri+%3 maltoz+1 g/l kazein hidrozilat +0.7 g/l proline+5 μM bakır sülfat) besin ortamlarında, direk çoklu sürgün üretimi için buğday (kışlık, yazlık, durum buğdayı olmak 3 ayrı genotip), arpa, yulaf ve triticale çeşitlerinin farklı genotiplerinin olgun embriyoları kültüre alınmıştır. Yulaf için en iyi sonuç, explant başına 69 sürgün ile 1 mg/l TDZ+1 mg/l BAP içeren ortamda elde edilmiştir. Sadece TDZ içeren ortamda ise explant başına 16 sürgün elde edilmiştir. Buğday genotipleri arasında ise durum buğdayında, 1 mg/l TDZ +1 mg/l BAP içeren ortamda, explant başına 35 sürgün ile en iyi sonuç elde edilmiştir. Sadece TDZ içeren ortamda ise explant başına 27-32 arasında

sürgün elde edilmiştir. Kışlık buğdayda ise en iyi sonuç, explant başına 11-25 arasında sürgün ile 2 mg/l TDZ+1 mg/l BAP içeren ortamda elde edilmiştir. Triticale için en iyi sonuç ise explant başına 34 sürgün ile 2 mg/l TDZ +1 mg/l BAP içeren ortamda elde edilmiştir. Arpa için en iyi sonuç ise, explant başına 5-6 sürgün ile, iki sıralı arpa genotipinde 1 mg/l TDZ+1 mg/l BAP içeren ortamda, altı sıralı arpa genotipinde 1mg/l TDZ+2 mg/l BAP içeren ortamda elde edilmiştir. Çalışılan tüm genotiplerde, sadece BAP içeren ortamlar sadece TDZ içeren ortamlara oranla çok daha düşük oranlarda sürgün gelişmiştir (Ganeshan ve ark., 2006).

Bouamama ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada, orijini Kerkena adası olan bir Tunus arpasının rejenerasyon yeteneğini somatik embriyogenesis ve organogenesis aracılığıyla araştırmışlardır. Çimlenmeyi azaltmak veya engellemek amacıyla yaralanmış ya da uzunlamasına ikiye ayrılmış olgun karyopsisleri, büyüme düzenleyicileri ile zenginleştirilmiş modifiye CP (Chee ve Pool, 1987) besin ortamında kültüre almışlardır. En iyi embriyogenesis sonucu, yaralanmış karyopsislerin 2 mg/l CPA+2.5 mg/l Kinetin içeren CP besin ortamında kültüre alınmasıyla elde edilmiştir (%75.85). Embriyogenik kalluslar, büyüme düzenleyicisiz MS besin ortamında somatik embriyoların farklılaşma aşamalarının (globular, torpido, kalp) tamamını geçirmişlerdir. Köklenen bitkiler başarılı bir şekilde toprağa transfer edilmiş olgunluk haline gelinceye kadar serada yetiştirilmiş ve fertil tohumlar 3 ay içinde üretilmiştir. Organogenesis ise, 2 mg/l 2.4-D+2.5 mg/l Kin içeren CP besin ortamında başarıyla tamamlanmıştır. Çalışılan arpa çeşidindeki bu etkili rejenerasyon sistemi transgenik bitkilerin elde edilmesini ve germplazm korunmasına olanak sağlamaktadır.

Ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinde çalışan Varshney ve ark (1999), olgun embriyoları 2.4-D'nin (0.5, 2.5 ve 5.0 mg/l) farklı dozlarına sahip MS ortamında kültüre almışlar ve rejenerasyon için 2.5 mg/l'lik 2.4-D'nin optimum olduğunu belirlemişlerdir.

Li ve ark. (2003), buğday rejenerasyonu için ve 2 mg/l 2.4-D içeren MB ortamında (MS tuzları +B5 vitamini + 2 mg/l glycine, 300 mg/l glutamin + 500 mg/l kazein hidrozilat + %3 sakkaroz + %0,7 agar) olgun embriyoları kültüre almışlar. Daha sonra bitki rejenerasyonu için kalluslar TDZ içeren MB ortamına aktarılmış ve TDZ'nin 1 mg/l dozunun uygun değer olduğu belirlenmiştir.

Popelka ve Altpeter (2001), kendilenmiş üç çavdar hattının olgunlaşmamış embriyolarını MS besin ortamında karbonhidrat ve oksin kaynaklarının çeşitli konsantrasyonlarda kültüre almışlar ve araştırıcılar kallus oluşumu üzerine karbonhidrat

kaynaklarının etkili olmadığını, 2.4-D içeren ortamın dikamba ve pikloram içeren ortamdan daha önemli olduğunu bildirmişlerdir. Eksplant kaynağı olarak endosperm destekli olgun embriyo kullanılması durumunda, kültürden önce yüksek dozda uygulanan 2.4-D gibi bitki büyüme düzenleyicilerinin somaklonal varyasyona neden olduğu saptanmıştır.

Abebe ve ark. (2008) mısırda yaptıkları doku kültürü çalışmasında olgun embriyo kültürünü kullanarak bitki rejenerasyonunu araştırmışlardır. Bunun için bir saf hat mısır ve bir de açıkta tozlanmış tropikal mısır hattı olmak üzere iki farklı çeşit kullanmışlardır. Maksimum ortalama kallus oluşumu B5 vitaminleri ile oluşturulmuş LS ortamında elde edilmiştir. Kallus oluşum frekansı yalnız 3 mg/l 2.4-D büyüme düzenleyici içeren LS ortamında %90, 3 mg/l 2,4-D ve 3 mg/l kinetin ile kombinasyonlu LS ortamında ise %52.5 bulunmuştur. Rejenerasyon frekansı saf hat mısır için % 21.14, açıkta tozlanmış mısır hattı için % 16.51 bulunmuştur.

Kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu için besin ortamlarında bulunan mineral maddeler ve vitaminler diğer bir önemli öğedir. MS temel besin ortamı embriyogenesis çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Özcan ve ark., 2001). Bunun dışında B5, N6 ve CC ortamları da kullanılan diğer ortamlardır.

Arpada, kallus teşvik ve rejenerasyon ortamlarına bakır sülfat ilave edilmesi, olgunlaşmamış embriyodan bitki rejenerasyonunu önemli oranda artırmıştır. ‘Hector’ ve ‘Excel’ çeşitlerinin embriyoları 0, 0.1 (MS level), 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 50.0 ve 100.0 µM bakır sülfat içeren MS ortamlarında kültüre alınmıştır. ‘Hector’ çeşidinde 50.0 µM bakır sülfat içeren ortamda diğer ortamlara kıyasla embriyo başına 17 rejenerant bitki ile en iyi sonuç elde edilirken, MS seviyesinde bakır sülfat içeren (0.1 µM) ortamda ise embriyo başına sadece 5 rejenerant bitki elde edilmiştir. ‘Excel’ çeşidinde ise, 5.0 µM bakır sülfat içeren ortamda embriyo başına 1.4 rejenerant bitki ile en iyi sonuç elde edilirken, MS seviyesinde bakır sülfat içeren ortamda rejenerant bitki elde edilememiştir. Sonuçlar göstermektedir ki, MS seviyesindeki bakır sülfat miktarı arpa rejenerasyonu için uygun değildir ve yüksek bakır sülfat konsantrasyonu bitki rejenerasyonunu artırmaktadır (Dahleen, 1995).

Olgun arpa embriyoları, farklı büyüme düzenleyicilerinin kombinasyonları ile besin element içerikleri birbirinden farklı 4 ortamda kültüre alınmıştır. En fazla kallus oluşumu %75.5 ile 2 mg/l 2.4-D içeren J25-8 (Jensen, 1977) ortamında elde edilirken, aynı konsantrasyonda 2.4-D içeren MS ortamında bu değer %35’e düşmüştür. J25-8 ortamında elde edilen bu kallusların %80-85’inde, yine aynı ortamda 1 mg/l IBA ve 0.1

mg/l Kin büyüme düzenleyicisi kombinasyonunda rejenerant bitkiler elde edilmiştir (Zapata ve ark., 2004).

Tohumlardan elde edilen olgun embriyolar doğrudan doku kültüründe kullanılabileceği gibi (Ozias-Akins ve Vasil 1983; Özgen ve ark., 1998; Delporte ve ark., 2001) endosperm destekli olgun embriyolar (Özgen ve ark., 1996; Özgen ve ark., 1998) ve ince olgun embriyo parçaları da (Delporte ve ark., 2001; Zale ve ark., 2004) kallus oluşturma ve bitki rejenerasyonu için eksplant olarak kullanılabilirler.

Dağlık arpa (*Hordeum vulgare* L. Var. Nudum Hk. f.) çeşidinde, etkili bitki rejenerasyonu için, endosperm destekli olgun embriyolardan, *in vitro* bir protokol geliştirilmiştir. Embriyolar endospermli (ES) ya da endospermsiz (NES) olmak üzere olgun tohumlardan çıkarılmış ve çeşitli konsantrasyonlarda 2.4-D (1-5 mg/l) içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır. ES explantlarında kallus oluşumu NES explantlarına oranla önemli bir şekilde düşüktür ($P<0.05$).Kallus oluşum oranı, 3 mg/l 2.4-D içeren MS besin ortamında ve NES explantlarında en yüksektir (% 97.6). Oluşan kalluslar 3 hafta boyunca 2.4-D (0.5 mg/l)içeren besin ortamında kültüre alındığında embriyogenik kalluslar elde edilmiştir. Embriyogenik kalluslar, sürgün rejenerasyonu için farklı konsantrasyonlarda BAP (1-5 mg/l) ve 500 mg/l kazein hidrozilat içeren MS besin ortamına transfer edilmiştir. ES explantlarından elde edilen kallusların rejenerasyon kapasitesi NES explantlarına oranla önemli bir şekilde yüksektir ($P<0.05$). En iyi sonuç, 2 mg/l BAP içeren MS besin ortamında ES explantlarından meydana gelen kalluslardan elde edilmiştir (%81.3) kök sistemleri iyi gelişen rejenerant bitkiler saksılara aktarılmış ve olgunluğa ulaşıncaya kadar iyi şartlarda yetiştirilmiştir. Sonunda ise fertil tohumlar elde edilmiştir. Bu metot genetik manipülasyon çalışmaları için başlangıç olmaktadır (He ve Jia, 2008).

Gubisova ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada, ekplant tipinin (tüm embriyo, scutellum, embriyonik eksen, embriyonik eksenin metistematik/merkez bölgesi) ve bitki büyüme düzenleyicilerinin (BAP ya da TDZ) olgun embriyo rejenerasyonunda etkisini belirlemişlerdir. Explant tipi rejenerasyon etkinliğini büyük ölçüde etkilemiştir. Tüm embriyoların ya da embriyonik eksenlerin explant olarak kullanımı sonucu yüksek oranda rejenerant bitki elde edilirken, olgun scutellumların explant olarak kullanımında rejenerant bitkiler elde edilememiştir. Apikal ve basal kısımları çıkarılmış embriyonik eksenlerin kullanılması, rejenerasyon etkinliğini azaltmıştır. 0.1 mg/l ya da 1 mg/l konstransyonlarda TDZ ve BAP içeren rejenerasyon ortamlarında rejenerasyon etkinliği açısından istatistiksel bir farklılık elde edilmemiştir. Sonunda, 9 slovak yazlık arpa

çeşidi ve model çeşit olarak Golden promise genotiplerinin olgun embriyolarının rejenerasyon yetenekleri incelenmiş ve arpa genetik transformasyon çalışmalarında yaygın kullanılan olgunlaşmamış embriyoların rejenerasyon yetenekleri ile kıyaslanmıştır. Genel olarak, olgun embriyodan rejenerasyon çok zayıf olmasına rağmen, model çeşit olan Golden promise ve iki Slovak arpa çeşidinde hem olgunlaşmış embriyodan hem de olgunlaşmamış embriyodan yüksek oranda rejenerasyon elde edilmiştir.

Triticalede çalışan Birsin ve Özgen (2004), eksplant kaynağı olarak olgunlaşmamış embriyo, endosperm destekli olgun embriyo ve endospermden tamamen ayrılmış embriyoyu kullanmışlar. Endosperm destekli olgun embriyoyu 8 mg/l 2.4-D'de, endospermden tamamen ayrılmış olgun embriyoları ise 2 mg/l 2.4-D içeren MS ortamında kültüre almışlardır. En yüksek bitki rejenerasyonunun endosperm destekli olgun embriyoda meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Kışlık buğdayda çalışan Turhan ve Baser (2004), endosperm destekli ve endospermsiz olgun embriyoları MS (kontrol), MS + 8 mg/l 2.4-D, MS + 2 mg/l NAA, MS + 4 mg/l 2.4-D +1 mg/l NAA ve MS + 4 mg/l 2.4-D + 2mg/l NAA içeren 5 farklı ortamda kültüre almışlardır. En yüksek kallus oluşumunun 4 mg/l 2.4-D + 1 mg/l NAA içeren ortamda endosperm desteksiz olgun embriyoda meydana geldiğini saptamışlardır. Yine aynı çalışmada en yüksek embriyogenik kallus oluşumunun endospermsiz olgun embriyoda meydana geldiğini tespit etmişlerdir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Bu çalışmada Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen Karatay-94, Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen Bülbül-89 çeşitleri ile Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümünden alınan Karatay-94 x Bülbül-89 melezinin F_2 generasyonundaki tohumları bitki materyali olarak kullanılmıştır (Çizelge 3.1.). Çalışmanın anter kültürü kısmında uygun dönemdeki başaklarından alınan anterler materyal olarak kullanılırken, embriyo kültürü kısmında bu genotiplerin tohumlarından elde edilen olgun embriyolar kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan arpa genotiplerinin genel özellikleri

GENOTİPLER	ÖZELLİKLER
Karatay-94	İki sıralı, beyaz taneli ve kılçıklıdır. Alternatif gelişme tabiatlı, kurağa dayanıklı, soğuğa ise orta dayanıklıdır. Yemlik ve maltlık olarak kullanılmaktadır.
Bülbül-89	İki sıralı, beyaz taneli ve kılçıklıdır. Kurağa ve soğuğa dayanıklıdır. Yemlik olarak kullanılmaktadır.
KxB Melezi	Karatay-94 ve Bülbül-89 çeşitlerinin F2 generasyonundaki bitki melezi. İki sıralı, beyaz taneli ve kılçıklı

3.2. Metod

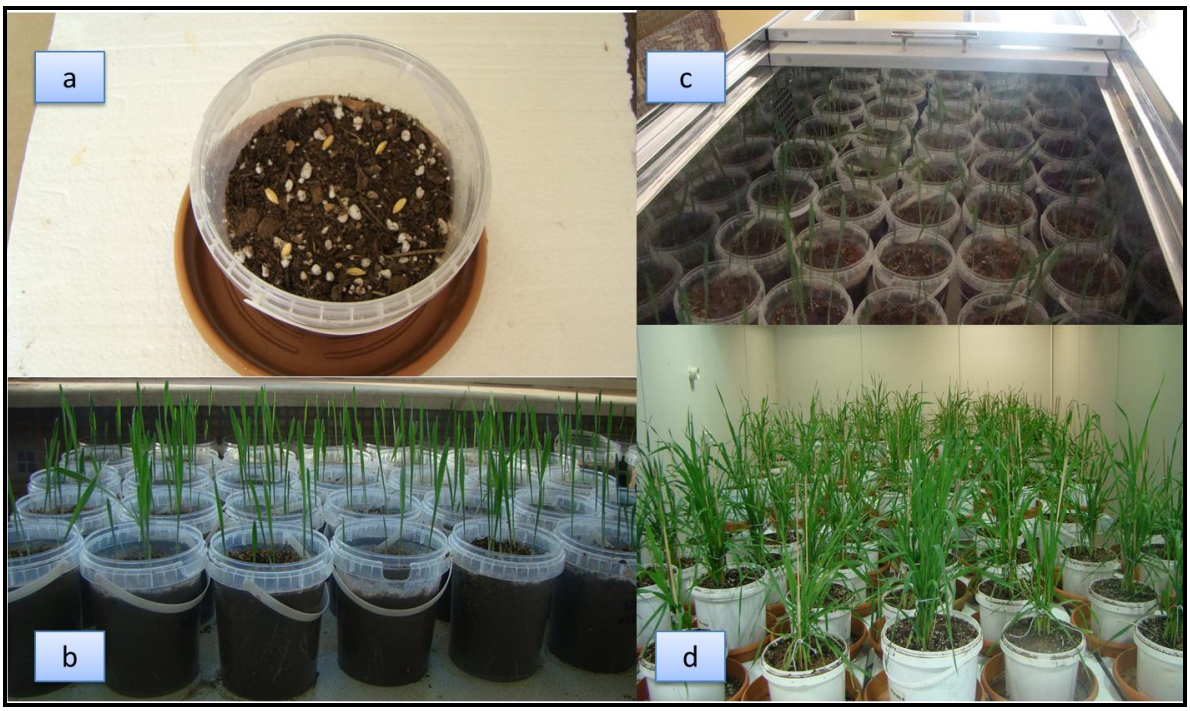
Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı ve İklim Odalarında yürütülen bu tez çalışması süresince 3 arpa genotipinde (Karatay-94, Bülbül-89 ve KxB Melezi) anter ve embriyo kültürü çalışmaları ayrı ayrı yürütülmüştür.

3.2.1. Anter kültürü

3.2.1.1. Donör bitkilerin yetiştirilmesi

Anter kültürü çalışmalarında materyal olarak uygun dönemdeki başaklardan alınan anterler kullanıldığından genotiplerin kontrollü şartlar altında yetiştirilmesi gerekmiştir.

Bitkilerin sağlıklı gelişimini sağlamak için toprak+torf+perlit (1:1:1) eşit oranlarda karıştırılarak kullanılmış ve eşit büyüklükteki saksılara ekim yapılmıştır. Başlangıçta 1 kg'lık saksılara, her bir saksıda 6 adet tohum olacak şekilde ekim yapılmış ve çimlenmeden 10 gün sonra bitkilerin vernalizasyon ihtiyaçlarını karşılamak amaçlı sıcaklığı 4°C'ye ayarlanmış olan buzdolabına konulmuştur. Burada 4–5 hafta boyunca 4°C'de, 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık fotoperiyodizmde bitkiler vernalize edilmiştir. Daha sonra her bir saksı 5 kg'lık saksıya aktarılmış ve kontrollü şartlarda tutulan iklim odasına alınmıştır. Ayrıca bitkilerin sağlıklı gelişimi açısından, her bir saksıya 7 günde bir 500 ml su ile sulanmış, 15 günde bir de 250 ml olacak şekilde half hoagland çözeltisi verilmiştir. 24±2°C'de, 16 saat aydınlık, 8 saat karanlıkta tutularak başakların istenen büyüklüğe gelmesi beklenmiştir.



Şekil 3.1. Donör bitkilerin laboratuvar koşullarında yetiştirilmesi a) Ekim aşaması b) 10 günlük bitkiler c)Vernalizasyon aşaması d) İklim odasında gelişme

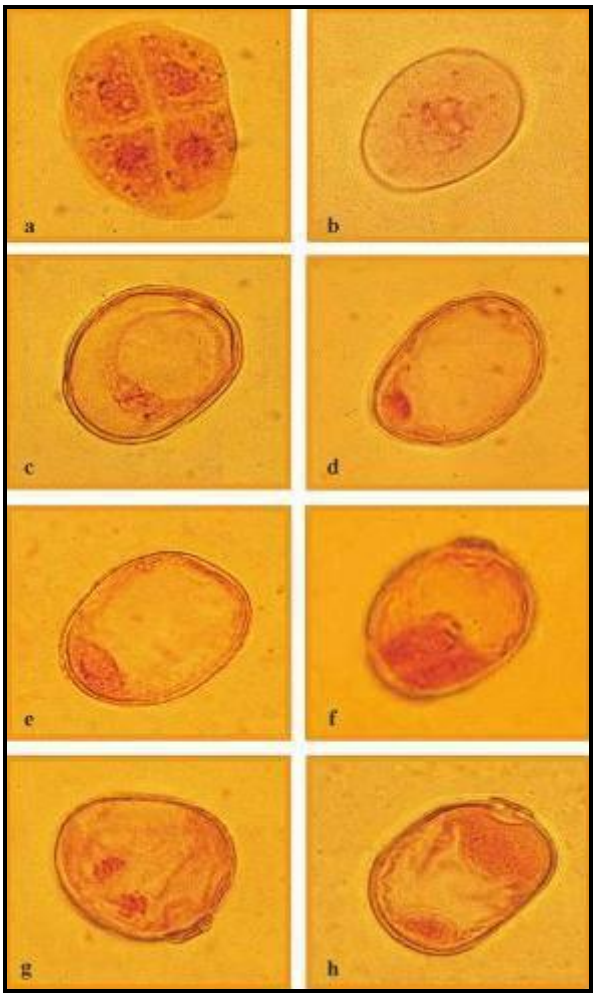
3.2.1.2. Uygun mikrospor safhasının belirlenmesi ve donör bitkilerin hasadı

Anter kültürü çalışmalarında uygun mikrospor safhasını belirlemek için başağın morfolojisi (kılçık boyu) ile mikrosporların gelişme safhası arasında bir ilişki kurulmaktadır. Çalışmada androgenesis çalışmalarında genel kabul gören tek çekirdekli mikrospor safhasını içeren başak morfolojisi belirlenmeye çalışılmıştır. Ancak bunu

belirleyebilmek için *in vivo* mikrospor gelişiminin tüm aşamalarının (Şekil 3.2.) tespit edilmesi gerekmektedir. Bu aşamaların belirlenebilmesi için kullanılan farklı sitolojik yöntemler bulunmaktadır. Bizim çalıştığımız yöntem ise aşağıda açıklanmıştır.

Asetokarmin ile boyama: Tek çekirdekli mikrospor safhasını tespit etmek amacıyla kullanılan yöntemler arasında en pratik yöntem olarak bilinen bu yöntemde, farklı büyüklükteki canlı başaklardan alınan anterler lam üzerine yerleştirilmiş ve bisturi ucu yardımıyla anterlerin içerisindeki mikrosporlar serbest hale getirilmiştir. Üzerine 1-2 damla asetokarmin damlatıldıktan sonra üstü lamelle kapatılan ezme preparatlar ışık mikroskobunda incelenmiştir.

Asetokarmin hazırlanışı: 55 ml saf su içerisine 45 ml glasiyel asetik asit ilave edilerek kaynatılmış ve sonra bu karışıma 1 g karmin eklenerek filtre edilmiş ve 12 saat sonra kullanıma hazır hale gelmiştir.



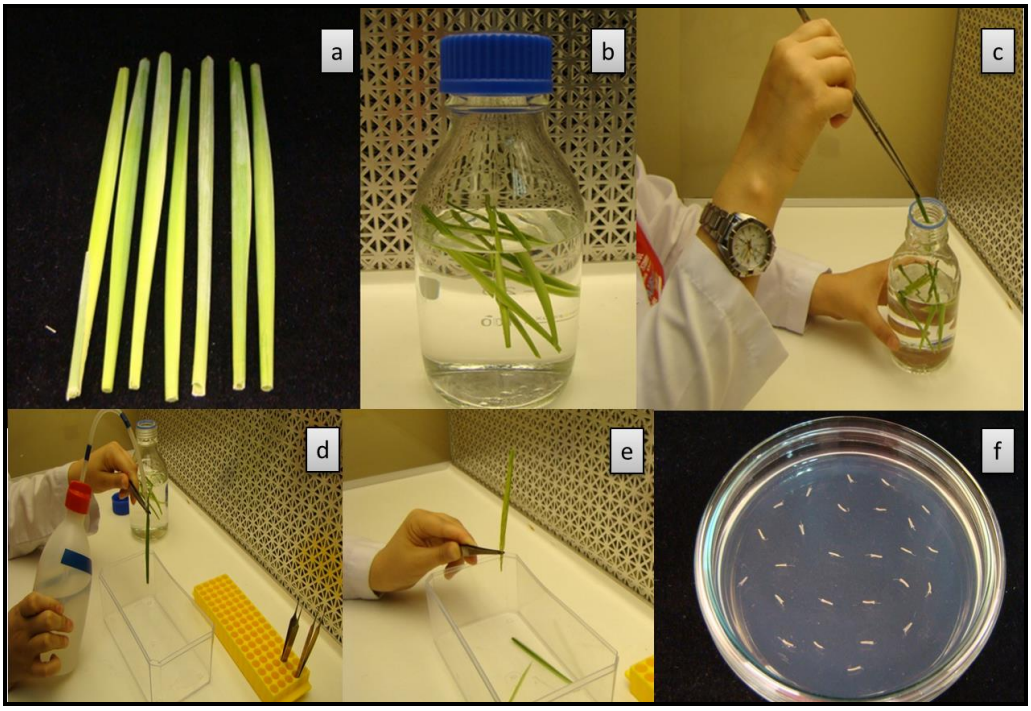
Şekil 3.2. Mikrospor gelişim dönemleri a) tetrad dönemi b) erken tek çekirdekli dönem c) erken orta tek çekirdekli dönem d) orta tek çekirdekli dönem e) orta-geç tek çekirdekli dönem f) geç tek çekirdekli dönem g) ilk mikrospor bölünmesinin anafaz dönemi h) iki çekirdekli dönem (Szarejko, 2003).

3.2.1.3. Sterilizasyon

Çalışma ortamının ve kullanılan aletlerin sterilizasyonu; Steril çalışma alanında kullanılacak yüzeyler (steril kabin içi) kullanımdan en az 10–15 dakika önce %96'lık alkolle silinerek UV lambası açılmıştır. Çalışmaya başlamadan önce UV lambası kapatılmıştır. Kullanılan aletler (bisturi, pens vb.) kullanımdan önce etil alkol içine batırıldıktan sonra alev lambasına tutularak alevle yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Eksplantların kesimi, alüminyum folyo içine sarılarak otoklav edilmiş 10 x15 cm boyutlarındaki fayanslar üzerinde yapılmıştır.

Besin ortamlarının ve bitki büyüme düzenleyicilerinin sterilizasyonu; Besi ortamların sterilizasyon için hazırlanan besi ortamları otoklavda 20 dakika boyunca 1.5 atm basınçta 121°C'de tutulmuşlardır. Sıcakta bozulan vitaminlerin, bitki büyüme düzenleyicilerinin ve diğer maddelerin sterilizasyonu ise steril kabin içinde 0,22 µm poroziteli filtreler (milipor) kullanılarak yapılmıştır.

Başak sterilizasyonu; Uygun dönemde toplanan başakların sap ve yaprakları temizlendikten sonra, steril kabin içerisinde %70'lik etil alkol ile 2 dakika süreyle yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuş sonrasında ise 3 kez steril saf su ile durulanarak sterilizasyon işlemi tamamlanmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Anter kültüründe sterilizasyon aşamaları ve anterlerin kültüre alınması a) Başakların yapraklarından temizlenmesi b-c-d) Sterilizasyon aşamaları e-f) Kültüre alma işlemi

3.2.1.4. Besin ortamlarının ve stok çözeltilerin hazırlanması

Arpa, anter kültürü çalışmalarda yaygın olarak kullanılan FHG (Hunter, 1987), BAC3 (Szarejko ve Kasha, 1991) ve C3 (Jacquard, 2003) besin ortamları kullanılmıştır. Bu ortamların içerikleri Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Kullanılan besin ortamlarının karşılaştırmalı içerikleri (mg/l)

	Kallus teşvik ortamları			**Rejenerasyon ortamları**		
Besin Ortamları	**FHG**	**C3**	**BAC3**	**FHG**	**C3**	**BAC3**
Makro Elementler						
KNO3	1900	1900	2600	1900	1900	2600
$MgSO_4$.$7H_2O$	370	374	300	370	374	300
$(NH4)_2SO_4$	---	---	400	---	---	400
KH_2PO_4	170	170	170	170	170	170
NH_4NO_3	165	166	200	165	166	200
$NaH_2PO_4.H_2O$	---	---	150	---	---	150
$CaCl_2.2H_2O$	440	220	600	440	220	600
Mikro Elementler						
$MnSO_4.4H_2O$	22.3	22.3	5	22.3	22.3	5
$ZnSO_4.7H_2O$	8.6	8.6	2	8.6	8.6	2
H_3BO_3	6.2	6.2	5	6.2	6.2	5
Kl	0.83	0.83	0.8	0.83	0.83	0.8
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
$Cu.SO_4.5H_2O$	0.025	2.5	0.025	0.025	0.025	0.025
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	---	0.025	0.025	---	0.025
$FeNa_2$. EDTA	37.5	40	40	37.5	40	40
Karbon kaynağı						
Sakkaroz	----	----	----	----	----	30.000
Maltoz	62.000	60.000	60.000	31.000	30.000	---
Ortam Katılaştırıcı						
Phytagel	----	----	----	3.000	----	---
Gelrite	----	----	----	----	----	3.000
Agarose	----	7.000				
Amino asitler						
Glutamin	730	752	----	---	752	---
Organik Asitler						
Sitrik asit	----	----	10	----	---	10
Pyruvik asit	----	----	10	----	----	10
Vitaminler						
myo-inositol	100	0.1	2000	100	0.1	100
Piridoksin-HCl	---	----	0.5	---	----	0.5
Tiamin-HCl	0.4	0.4	1	0.4	0.4	1
Nikotinik asit	----	----	0.5	----	---	0.5
Askorbik asit	----	---	1	----	----	1
Diğer İnorganik Bileşikler						
$KHCO_3$	---	----	50	---	----	50
$AgNO_3$	---	-----	10	---	---	10
Diğer Organik Bileşikler						
Kazein Hidrozilat	---	----	300	---	----	300
Ficoll 400	200.000/ 400.000	---	300.000	----	----	---
pH	5.8	5.6	6.2	5.8	5.6	6.2

3.2.1.4.1. Ön uygulama ortamı

Uygun mikrospor aşamasında olduğu belirlenen bitkiler hasat edildikten sonra başakları, 4°C'de, 0 (kontrol), 4, 21, 28 gün olmak üzere 4 farklı sürede muhafaza edilmiştir. Sonrasında sterilize edilen başaklardan alınan anterler, ön uygulama ortamlarında kültüre alınmıştır. Ön uygulama işlemi çalışmada kullanılacak ortamlara göre değişmektedir (Çizelge 3.3.).

BAC3 ortamı için ($BAC3_1$); 0.7 M manitol içeren ön uygulama ortamı hazırlanıp, sterilize edilmiş başaklardan alınan anterler bu ortama yerleştirilerek, 24°C'de, karanlıkta, 4 gün boyunca kültüre alınmıştır.

FHG ortamı için (FHG_1); 0.7 M manitol, 40 mM $CaCI_2x2H_2O$ ve 8 g/l agarose içeren ön uygulama ortamı hazırlanıp, sterilize edilmiş başaklardan alınan anterler bu ortama yerleştirilerek, 24°C'de, karanlıkta, 4 gün boyunca kültüre alınmıştır.

C3 ortamı için ($C3_1$); 0.7 M manitol, 40 mM $CuSO_4x5H_2O$ içeren ön uygulama ortamı hazırlanıp sterilize edilmiş başaklardan alınan anterler bu ortama yerleştirilerek, 4°C'de, karanlıkta, 4 gün boyunca kültüre alınmıştır.

Çizelge 3.3. Ön uygulama ve kallus teşvik ortamları

Ön Uygulama Ortamı	Kallus Teşvik Ortamı-Büyüme Düzenleyicisi (mg/l)
FHG_1	FHG + l BAP
	FHG + 1 BAP+2 NAA
	FHG +1 BAP+ 2 2.4-D
$C3_1$	C3 + l BAP
	C3 + 1 BAP+2 NAA
	C3 +1 BAP+ 2 2.4-D
$BAC3_1$	BAC3 + l BAP
	BAC3 + 1 BAP+2 NAA
	BAC3 +1 BAP+ 2 2.4-D

3.2.1.4.2. Kallus teşvik ortamı (İndüksiyon ortamı)

Araştırmada çalışılan FHG, BAC3 ve C3 ortamlarının her biri için 1 mg/l BAP, 1 mg/l BAP x 2 mg/l NAA, 1 mg/l BAP x 2 mg/l 2.4-D büyüleme düzenleyicileri kullanılmıştır. Ön uygulama ortamlarından, kallus teşvik ortamlarına aktarılan anterler 24 ± 2ºC sıcaklık, %65 nem ve karanlık şartlarda kültüre alınıp, 3-4 hafta boyunca gelişimleri izlenmiştir.

Kallus teşvik ortamlarının hazırlanması için aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulanmıştır:

1. 1 litre besin ortamı hazırlamak için 2 litrelik bir erlene 800 ml saf su konulmuştur.

2. Makro elementler sırasıyla hassas terazide tartılarak ortama ilave edilmiştir.

3. x100 olacak şekilde hazırlanmış mikro element stok solüsyonları Gilson pipet ile 1 ml/l şeklinde ortama ilave edilmiştir.

4. Karbon kaynağı hazırlanan ortamın türüne göre Çizelge 3.2.'de belirtildiği miktarda ilave edilmiştir.

5. Ortamın pH'sı 0.1-1 N KOH ya da 0.1-1 N HCI solüsyonları kullanılarak ayarlanmıştır.

4. Dereceli silindire aktarılan çözeltinin hacmi otoklav sonrası ilave edilecek madde hacmi dikkate alınarak tamamlanmıştır.

5. Sonrasında ise otoklavda 20 dakika boyunca 1.5 atm basınçta 121°C'de sterilizasyona tabi tutulmuştur.

6. Isıdan etkilenen kimyasallar ayrı bir çözelti olarak hazırlanmıştır. Bu kimyasallar FHG, BAC3 ve C3 ortamlarına göre Çizelge 3.2.'de belirtilen miktarlarda tartılıp hacmi saf su tamamlandıktan ve filtreden geçirildikten sonra otoklavdan çıkan steril ortama eklenmiştir.

7. Isıdan etkilenmeyen büyüme düzenleyiciler otoklavdan önce, ısıdan etkilenen büyüme düzenleyicileri filtre ile sterilize edilerek otoklav sonrası, istenilen konsantrasyonlarda ortama eklenmiştir.

8. Ortamlar 60 x15 mm'lik steril petrilere 10 ml olacak şekilde paylaştırılmıştır.

Kallus teşvik ortamları için öncelikle kullanılan büyüme düzenleyicilerinin stok solüsyonları hazırlanmıştır. Büyüme düzenleyicilerinin stok solüsyonlarının hazırlanmasında, çözücü ve seyreltici olarak kullanılan kimyasallar ile saklama sıcaklıkları Çizelge 3.4.'te verilmiştir.

Çizelge 3.4.Büyüme düzenleyicilerinin stok solüsyonları

Oksin Tipi	Çözücü	Seyreltici	Saklama Koşulu
BAP	HCI	Su	+4°C
2.4-D	KOH	Su	+4°C
NAA	KOH	Su	+4°C

3.2.1.5. Anterlerin kültüre alınması

Steril hale getirilen başaklarda her başağın altında ve üstünde yeterince gelişmemiş başakçıklar uzaklaştırılacak ve her başağın orta kısmındaki başakçıklardan anterler steril pensler yardımıyla alınarak daha önce hazırlanmış içerisinde 10 ml besi ortamı bulunan 60 x 15 mm boyutlarında petri kaplarına alınmıştır. Her petri kabında 30 anter olmak üzere her kombinasyondan 20 petri, büyütme dolabında (Sanyo: MLR-351H), 24±2ºC sıcaklık, %65 nem ve karanlık şartlar altında kültüre alınmıştır.

3.2.1.6. Gözlem ve Ölçümler

Kültüre alınan anterlerin gelişme durumları görsel olarak gözlenmiştir. Kallus oluşmadığı için herhangi bir ölçüm alınamamıştır.

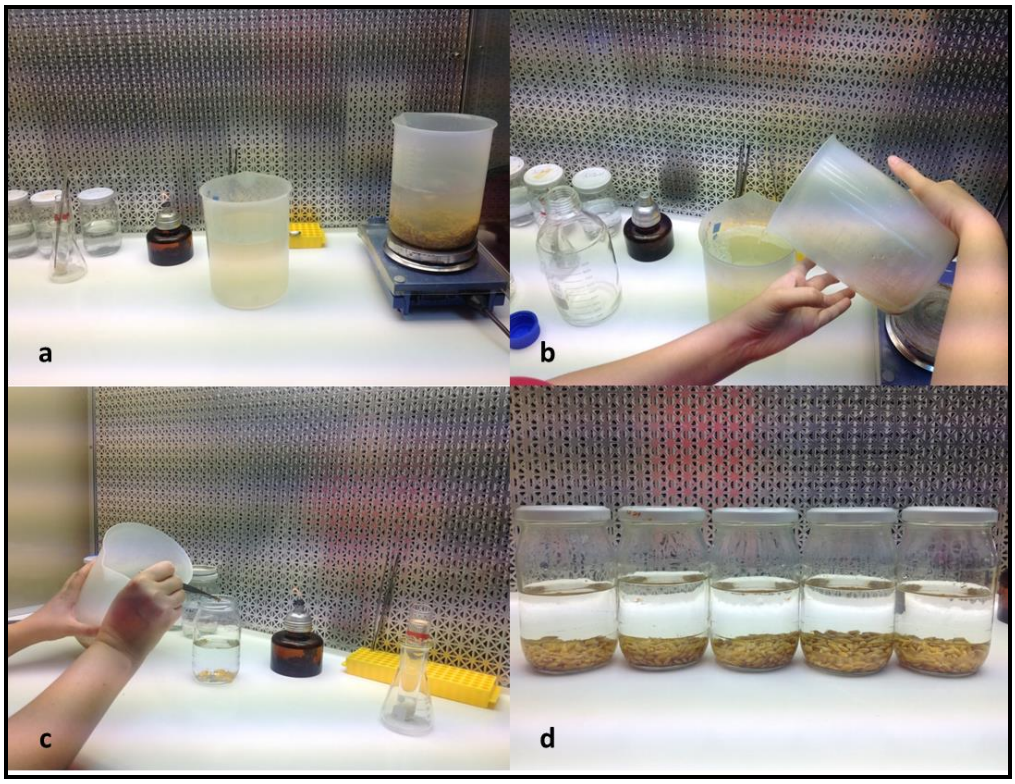
3.2.2. Embriyo kültürü

Embriyo kültüründe materyal olarak, çalışılan genotiplerin tohumlarından elde edilen olgun embriyolar kullanıldığından genotiplerin yetiştirilmesine gerek duyulmamıştır.

3.2.2.1. Sterilizasyon

Çalışma ortamının, kullanılan aletlerin, besin ortamlarının ve bitki büyüme düzenleyicilerinin sterilizasyonu **3.2.1.3.**'de açıklandığı gibi yapılmıştır.

Tohum sterilizasyonu; Embriyo kültürü için kullanılacak tohumlar akan musluk suyu altında yaklaşık 10 dakika yıkandıktan sonra steril kabin içerisinde manyetik karıştırıcıda %96'lik etil alkolde 2 dakika boyunca karıştırılarak bekletilmiş ve 1 kez steril saf suyla durulanmıştır. Ardından yine manyetik karıştırıcı üzerinde, birkaç damla Tween 20 (Sigma) içeren %20 sodyum hipoklorit çözeltisi içerisinde 20 dakika karıştırılarak bekletilmiş ve sonra 3 kez steril saf su ile durulanmıştır. Steril tohumlar steril saf su içinde 4°C'de 2 gün süreyle bekletilmiştir (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. Embriyo kültüründe sterilizasyon aşamaları (a-d)

3.2.2.2. Besin ortamlarının ve stok çözeltilerin hazırlanması

3.2.2.2.1. Kallus teşvik ortamları

Embriyo kültürü çalışmalarında kallus teşviki için uygun büyüme düzenleyicilerinin (oksinlerin) belirlenmesi amacıyla yürütülen denemede, olgun embriyolar 2 mg/l konsantrasyonunda 2.4-D, dikamba, pikloram ve 2.4.5-T oksinlerini ayrı ayrı içeren, MS (Murashige ve Skoog, 1962) besin ortamından modifiye edilerek MS_1 ve MS_2 kodları verilen besin ortamlarında kültüre alınmıştır (Çizelge 3.5.). İklim dolabında 24±2 ºC'de, karanlıkta, 4 hafta süreyle gelişimleri takip edilmiş; sonrasında çalışmalar, en iyi sonuç veren 2 farklı oksinin (dikamba ve 2.4-D) 3 farklı konsantrasyonunda (2, 4, 6 mg/l) her iki ortamda (MS_1 ve MS_2) yürütülmüştür. Kültüre alma işleminden yaklaşık 10 gün sonra, kallus gelişimin yanı sıra çimlenme faaliyeti gösteren embriyolarda oluşan sürgün ve kökler temizlenmiş, böylece kallus gelişimi hızlandırılmıştır.

Çizelge 3.5. Kallus teşviki için kullanılan besin ortamlarının MS karşılaştırmalı içerikleri (mg/l)

Komponentler	MS	MS_1	MS_2
Makro Elementler			
NH_4NO_3	1650	1650	1650
KNO_3	1900	1900	1900
KH_2PO_4	170	170	170
$MgSO_4$.$7H_2O$	370	370	370
Mikro Elementler			
$MnSO_4.4H_2O$	22.3	22.3	22.3
$ZnSO4.7H_2O$	8.6	8.6	8.6
H_3BO_3	6.2	6.2	6.2
Kl	0.83	0.83	0.83
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25	0.25	0.25
$Cu.SO_4.5H_2O$	0.025	1	1.25
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	0.025	0.025
$FeNa_2$ –EDTA	37.3	37.3	37.3
Vitaminler			
myo-inositol	100	200	200
Piridoksin-HCl	0.5	0.5	0.5
Tiamin-HCl	0.1	0.5	1
Nikotinik asit	0.5	0.5	0.5
Glisin	2.0	2.0	2.0
Karbon Kaynağı			
Sakkaroz	30.000	30.000	---
Maltoz	---	---	60.000
Ortam Katılaştırıcı			
Agar	8.000	8.000	8.000
Diğerleri			
Kazein hidrozilat	---	500	1.000
Glutamin	---	100	---
Proline	---	250	500
pH	5.8	5.8	5.8

Kallus teşvik ortamını hazırlamak için aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulanmıştır:

1. 1 litre besin ortamı hazırlamak için 2 litrelik bir erlene 800 ml saf su konulmuştur.

2. Makro elementler sırasıyla hassas terazide tartılarak ortama ilave edilmiştir.

3. x100 olacak şekilde hazırlanmış mikro element stok solüsyonları Gilson pipet ile 1 ml/l şeklinde ortama ilave edilmiştir.

4. Karbon kaynağı olarak MS_1 ortamında %3 (a/h) sakkaroz, MS_2 ortamında %6 (a/h) maltoz ilave edilmiştir.

5. Ortamın pH'sı 0.1-1 N KOH ya da 0.1-1 N HCI solüsyonları kullanılarak 5.8'e ayarlanmıştır.

4. Dereceli silindire aktarılan çözeltinin hacmi otoklav sonrası ilave edilecek madde hacmi dikkate alınarak 985 ml tamamlanmıştır.

5. %0.8 (a/h) agar içeren kavanoza boşaltılıp otoklavda 20 dakika boyunca 1.5 atm basınçta 121°C'de sterilizasyona tabi tutulmuştur.

6. Isıdan etkilenen glutamin, kazein hidrolizat ve proline ayrı bir çözelti olarak hazırlanmıştır. Maddeler MS_1 ve MS_2 ortamlarına göre Çizelge 3.4.'de belirtilen miktarlarda tartılıp hacmi saf su ile 15 ml'ye tamamlandıktan ve filtreden geçirildikten sonra otoklavdan çıkan steril ortama eklenmiştir.

7. Isıdan etkilenmeyen büyüme düzenleyiciler (2,4-D) otoklavdan önce, ısıdan etkilenen büyüme düzenleyicileri (2.4.5-T, dikamba ve pikloram) filtre ile sterilize edilerek otoklav sonrası, istenilen konsantrasyonlarda ortama eklenmiştir.

8. Ortamlar 100 x 20 mm'lik steril petrilere 30 ml olacak şekilde paylaştırılmıştır.

Kallus teşvik ortamı için öncelikle kullanılan oksinlerin stok solüsyonları hazırlanmıştır. Oksinlerin stok solüsyonlarının hazırlanmasında çözücü ve seyreltici olarak kullanılan kimyasallar ile saklama sıcaklıkları Çizelge 3.6.'te verilmiştir.

Çizelge 3.6. Oksinlerin stok solüsyonları

Oksin Tipi	Çözücü	Seyreltici	Saklama Koşulu
Dikamba	EtOH	Su	+4°C
Pikloram	KOH	Su	+4°C
2.4-D	KOH	Su	+4°C
2.4.5-T	KOH	Su	+4°C

3.2.2.2.2. Sürgün geliştirme ortamları

Kallus teşvik ortamında oluşan kalluslar 4 haftanın sonunda, Çizelge 3.7.'de belirtildiği gibi farklı konsantrasyonlarda TDZ ve BAP sitokininlerden her birini ayrı ayrı içeren MS_1 ortamlarına aktarılmıştır. Petriler, büyüme dolabında (Sanyo: MLR-

351H) 24±2ºC sıcaklık, % 65 nem, 5 LS ışık şiddeti, 16/8 fotoperiyot süresi olacak şekilde kültüre alınmıştır.

Çizelge 3.7.Sürgün teşvik ortamlarında kullanılan büyüme düzenleyicileri ve konsantrasyonları (mg/l)

Büyüme düzenleyicisi	Konsantrasyon
Kontrol	0.0
TDZ	0.2
	0.5
BAP	0.5
	1.0

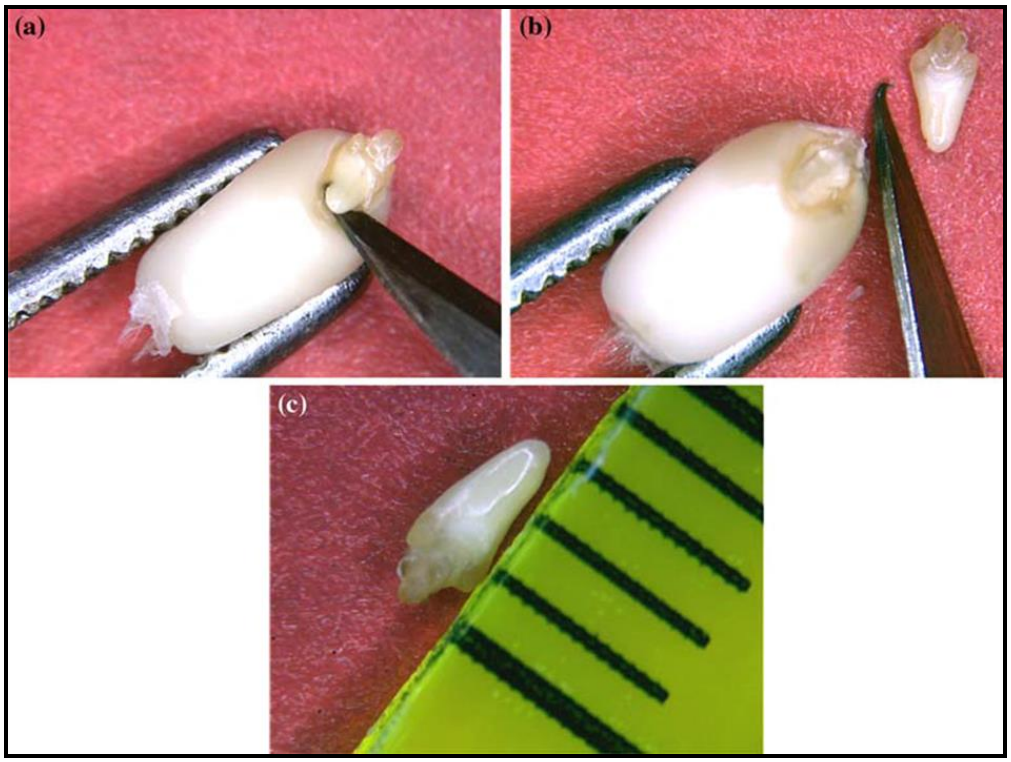
Sürgün teşvik ortamı olarak kullanılan ortamlar **3.2.2.2.1.**'de açıkladığı gibi hazırlanmıştır. Isıya dayanıklı BAP otoklav öncesi ortama ilave edilirken, ısıya duyarlı olan TDZ otoklav sonrasında filtre ile sterilize edilerek ilave edilmiştir. Sürgün teşvik ortamında kullanılan sitokininlerin stok solüsyonlarının hazırlanmasında çözücü ve seyreltici olarak kullanılan kimyasallar ile saklama sıcaklıkları Çizelge 3.8.'de verilmiştir.

Çizelge 3.8. Sitokininlerin stok solüsyonları

Sitokinin Tipi	Çözücü	Seyreltici	Saklama Koşulu
BAP	HCI	Su	+4°C
TDZ	KOH	Su	+4°C

3.2.2.3. Embriyoların kültüre alınması

Tohumlar, testaları yumuşatılarak embriyoların zarar görmeden tohumdan ayrılabilmesi için, sterilizasyon sonrasında steril su içinde 4°C'de 2 gün süreyle bekletilmiştir. Steril kabin içinde steril fayanslar üzerinde pens yardımıyla çıkarılan embriyolar kalkancıkları yukarı gelecek şekilde içerisinde 30 ml besin ortamı bulunan 100 x 20 mm boyutlarındaki petri kaplarında, her petride 10 embriyo olmak üzere 3 tekerrürlü ve her tekerrür 3 petriden oluşacak şekilde kültüre alınmıştır (Şekil 3.5.).



Şekil 3.5. Tohumdan embriyonun izalosyonu (Ganeshan, 2006)

3.2.2.4. Embriyo kültüründe gözlem ve incelemeler

Kallus oluşum yüzdesi (%): Eksplantlar kallus teşvik ortamına alındıktan 4 hafta sonra gözlemlenmiş, kallus oluşturan eksplant sayısı toplam eksplant sayısına oranlanarak Kallus oluşum oranı % olarak belirlenmiştir.

Kallus ağırlığı (mg/eksplant): Kallus teşvik ortamında her bir embriyodan gelişen kallusun ağırlığı, kültür başlangıcından 4 hafta sonra steril kabin içinde steril petri kullanılarak hassas terazide tartılmış ve mg olarak kaydedilmiştir.

Sürgün oluşum yüzdesi (%): Sürgün teşvik ortamına alınan kalluslarda kültüre alındıktan 4 hafta sonra oluşan sürgün başı sayısının toplam eksplant sayısına oranlanarak % olarak belirlenmiştir.

3.2.2.5. Verilerin değerlendirilmesi

Araştırmada tüm denemeler, tesadüf parsellerinde faktöriyel deneme desenine göre düzenlenmiş ve elde edilen veriler bilgisayarda MSTAT-C istatistik programı kullanılarak analiz edilmiştir. Önemli bulunan farklılıklar, LDS çoklu karşılaştırma testi ile karşılaştırılmıştır.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Anter Kültürü

4.1.1. *In vitro* şartlarda donör bitkilerin yetiştirilmesi

Arpa genotiplerine ait tohumlar laboratuvar şartlarında, eşit oranda torf+perlit+toprak içeren saksılarda çimlendirilmiş ve gelişen 10 günlük fideler, 4°C'de 4 hafta boyunca vernalizasyona tabi tutulmuştur. Bu sürenin sonunda fideler, kontrollü şartlarda altında tutulan (24±2°C, 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık) iklim odasına aktarılmış ve gelişimleri takip edilmiştir. İklim odasına alınan bütün fidelerin normal gelişimlerine devam ettikleri, vernalize oldukları ve vejetatif dönemden generatif döneme geçtikleri gözlemlenmiştir. Böylece tohumların ekiminden itibaren geçen yaklaşık iki ay süre sonunda anterler elde edilmiştir. Elde edilen anterlerin canlı ve tohum dölleme özelliğinde olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak, çalışmada kullanılacak olan bitkiler *in vitro* şartlarda yetiştirilmiş ve yaklaşık iki ay sürede canlı anterler elde edilmiştir. İklim şartlarına bağlı kalınmadan laboratuvar şartlarında anterlerin elde edilebilmesi, bu konudaki çalışmaların sürekliliği ve kesintiye uğramaması açısından önemlidir. Normal şartlarda bir yılda ve belirli bir dönemde anter temin edilebilirken yaptığımız çalışmada laboratuvar şartlarında istediğimiz zaman ve dönemde bunun elde edilebilme imkânı ortaya konmuştur. Jacquard ve ark. (2003), Jacquard ve ark. (2006) ve Lazaridou ve ark. (2010) tarafından yapılan arpa anter kültürü çalışmalarında da donör bitkiler *in vitro* şartlarda yetiştirilmiş ve sağlıklı bitkiler elde edilmiştir.

4.1.2. Uygun mikrospor safhasının belirlenmesi ve donör bitkilerin hasadı

Kılçık boyları 0.5, 1, 2 ve 3 cm uzunluğundaki başaklar ayrı gruplar halinde toplanmış ve her bir başağın orta kısmındaki başakçıklardan olmak üzere anterler izole edilmiştir. Bu anterler, ince uçlu pens yardımı ile başakçık içerisinden çıkarılıp asetokarmin metodu ile boyanarak mikroskopta incelenmiştir. Yapılan sitolojik incelemeler sonrasında Huang ve Sunderland (1982), Powell (1988), Szarejko (2003) ve Cistue ve ark. (2003) gibi pek çok araştırıcının da hemfikir oldukları erken tek çekirdekli ya da orta tek çekirdekli dönemde mikrosporlara sahip anterleri içeren başakların morfolojisi belirlenmiştir. Bu morfolojik gözlem şöyle tarif edilebilir; başak oluşumu sonrasında başaktan çıkan kılçıkların uzunluğu yaklaşık 1 cm olmalıdır. İklim

odasından donör bitkilerin hasadı çalışmada kolaylık sağlaması açısından bu morfolojik gözleme dayalı olarak yapılmıştır (Şekil 4.1.).



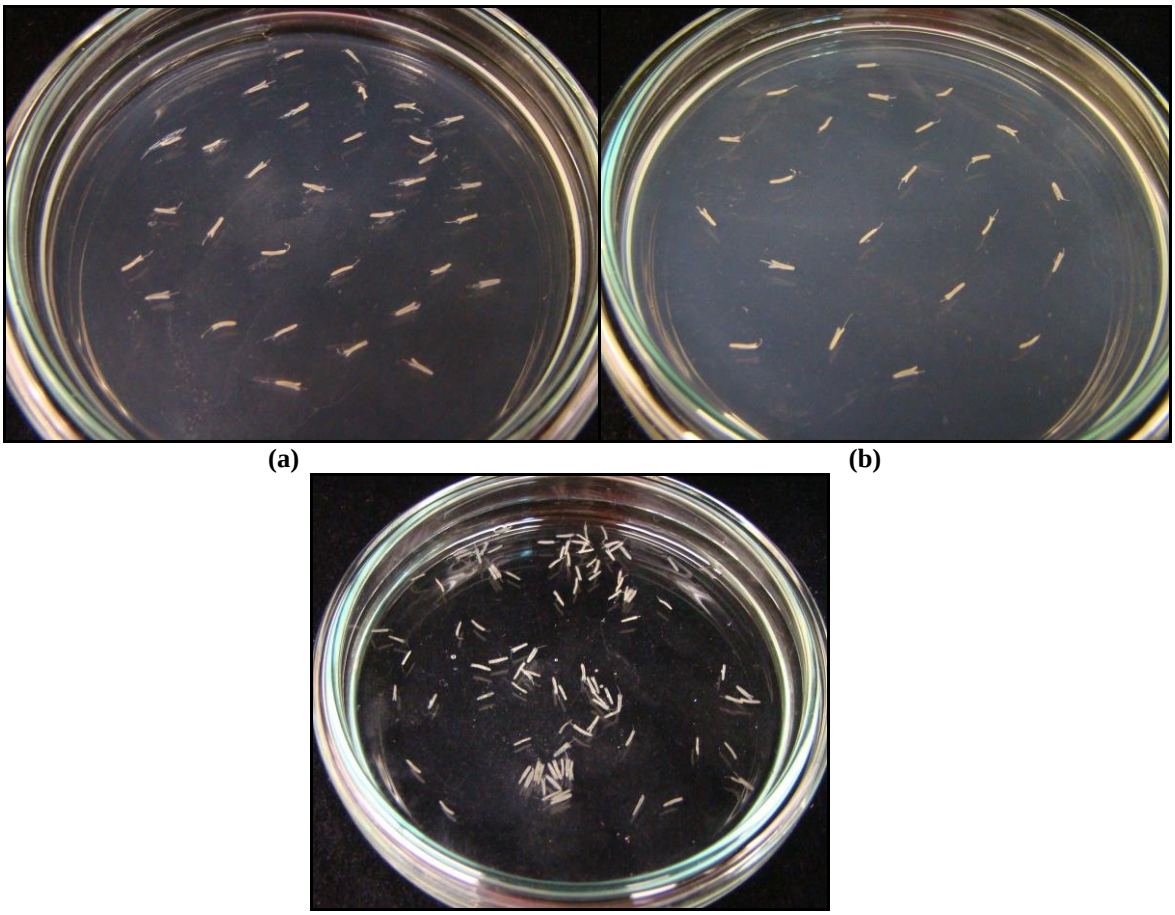
Şekil 4.1. Uygun aşamada mikrosporları içeren başaklar

4.1.3. Ön uygulama ve kallus teşvik ortamlarında anterlerin gelişme durumu

Çalışmamızda uygun mikrospor aşamasında olduğu belirlenen başaklar hasat edildikten sonra, 4°C'de 0, 4, 21, 28 gün boyunca soğuk uygulamaya tabi tutulmuştur. Arpa anter kültürü çalışmalarında, stres uygulamalarının gametofik gelişmeyi engellediği ve mikrosporlarda polen embriyogenesisini tetiklemek için gerekli olduğu ileri sürülmüştür (Cistue ve ark., 1999). Stres uygulamaları arasında ise en etkili olanının soğuk ön uygulamaları olduğu pek çok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Powell, 1988; Szarejko ve Kasha; 1991, Lezin ve ark. 1996).

Soğuk uygulamadan sonra sterilize edilen başakların anterleri FHG_1, $C3_1$, $BAC3_1$ olarak adlandıran, temelde manitol içeren farklı içerikli ortamlarda farklı şartlarda kültüre alınmıştır. Farklı araştırıcılar tarafından, manitol içerekli ön uygulama ortamlarının anterlerde, kallus ya da embriyoid ve sonrasında yeşil rejenerant bitki oluşumunu artırdığı tespit edilmiştir (Roberts-Oehlschlager ve Dunwell, 1990; Cistue ve ark. 1994; Cistué ve ark. 1999). Çalışmamız boyunca anterlerin gelişimleri günü gününe takip edilmiştir. Başlangıçta yeşil renkli olan anterler, ön uygulama ortamlarında kültüre alındıktan sonra sarı renge dönmüşler ve filamentleri uzamıştır. Bu anterler, ön uygulama ortamından sonra, kallus teşvik ortamlarına aktarılmıştır (FHG, C3, BAC3,).

Bu ortamlarda anterlerden kallus ya da embriyoidlerin oluşumu beklenmiştir (Hunter, 1987; Szarejko ve Kasha, 1991; Jacquard, 2003). Anterlerin boyutunda şişme meydana gelmiş, ancak beklenen gelişme gerçekleşmemiştir. Buna rağmen kültüre alınan anterlerin tamamında herhangi bir kararma görülmemiştir (Şekil 4.2.)



(a) **(b)**

(c)

Şekil 4.2. Kültüre alınmasında 4 hafta sonraki anterler (a) Karatay-94 (b) Bülbül-89 (c) KxB Melezi

Çalışmada anterlerden kallus oluşumunun ve yeşil bitki rejenerasyonunun sağlanamamasının nedeni, Larsen ve ark. (1991), Özü (2006), Jacquard ve ark. (2006)'nın da belirtildiği üzere anter kültürü çalışmalarında en temel etkenlerden biri olan genotipten kaynaklanabileceği gibi donör bitkinin yetişme koşulları ile anter kültürü tekniğinin uygulanması sırasındaki koşullarla da (anterlerin gelişme dönemi, anterlere yapılan ön uygulamalar, besin ortamının bileşimi ve yapısı, inkübasyon koşulları) ilgili olabileceği düşünülmüştür. Tahıllarda anter kültürü yoluyla yeşil bitkilerin rejenerasyonunun oldukça zor olduğu, kompleks bir genetik sistem tarafından kontrol edildiği ve bu sistemin de çevresel faktörler tarafından etkilendiği bildirilmiştir (Immonen ve Anttila, 1998; Zhou, 1996). Çalışılan genotiplerin anter kültürüne duyarlı/duyarsız olmasının etkisi kadar bitkilerin yetişme koşulları da önemli oranda

etkili olmuştur. Pek çok araştırmacı, tarlada yetiştirilen bitkilerin anter kültürüne yanıtının sera ya da iklim odalarında yetiştirilen bitkilere oranla daha yüksek olduğunu vurgulamıştır (Froughi-Wehr ve Mix, 1979; Gürel ve ark., 1992; Doğramacı-Altuntepe ve ark., 2001).

4.2. Embriyo Kültürü

4.2.1. Uygun oksin tipinin belirlenmesi

Üç farklı arpa genotipinde kallus uyarımını sağlayacak uygun oksin tipinin belirlenmesi amacıyla, embriyolar tohumlardan izole edilerek, modifiye edilmiş MS_1 ve MS_2 besin ortamları ile 4 farklı oksin tipinde (Dikamba, 2.4-D, 2.4.5-T, Pikloram) kültüre alınmıştır. En iyi oksin tipinin belirlenmesi için kurulan bu denemede, kültür başlangıcından 4 hafta sonra, her üç genotipin kallus oluşum yüzdeleri (%) ve kallus ağırlıkları (mg/eksplant) belirlenmiştir (Çizelge 4.1. ve Çizelge 4.2.).

Kallus oluşturma yüzdesi; MS_1 ve MS_2 ortamlarının 4 farklı oksin tipinde meydana gelen kallus oluşum yüzdelerine ait ortalama değerler Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Farklı arpa genotiplerinin kallus oluşturma yüzdeleri (%)

Genotip	**Karatay-94**			**Bülbül-89**			**KxB Melezi**		
B.D. (2 mg/l)	**MS_1**	**MS_2**	**Ort.**	**MS_1**	**MS_2**	**Ort.**	**MS_1**	**MS_2**	**Ort.**
Dikamba	23.3	16.7	20.0a	20.0	16.7	18.3a	23.3a	25.0a	24.2a
Pikloram	15.0	11.7	13.3b	11.7	10.0	10.8b	15.0b	10.0b	12.5b
2,4,5-T	11.7	11.6	11.7b	10.0	1.7	5.8c	6.7cd	0.0c	3.3c
2,4-D	6.7	1.6	4.2c	11.7	13.3	12.5b	13.3b	3.3bc	8.3bc
Ort.	14.2a	10.4b		13.3a	10.4b		14.6a	9.6b	
	$LSD_{\%1}$B.D.: 4.553			$LSD_{\%1}$B.D.: 4.553			$LSD_{\%1}$BD: 5.442 $LSD_{\%5}$B.O.x B.D.: 5.586		

Denemelerden elde edilen kallus oluşum yüzdelerine ait değerler, her genotip için ayrı ayrı varyans analizine tabi tutulmuş ve sonuçlar Çizelge 4.2.'de verilmiştir. Çizelge incelendiğinde, besin ortamının kallus oluşumuna etkisi istatistiki olarak Karatay-94 çeşidi ve KxB melezinde %1 düzeyinde önemli bulunurken, Bülbül-89 çeşidinde %5 düzeyinde önemli bulunmuştur. Büyüme düzenleyicilerinin kallus oluşumu üzerine etkisi tüm genotiplerde (Karatay-94, Bülbül-89 ve KxB Melezi) %1 düzeyinde önemli bulunmuştur. Besin ortamı x büyüme düzenleyicisi interaksiyonu ise sadece KxB melezinde %5 düzeyinde önemli bulunmuştur.

Çizelge 4.2. Farklı arpa genotiplerinin kallus oluşturma yüzdelerine ait varyans analiz değerleri

	Karatay-94			Bülbül-89			KxB Melezi		
VK	**SD**	**KO**	**F**	**SD**	**KO**	**F**	**SD**	**KO**	**F**
BO	1	84.368	11.5711**	1	51.036	6.1246*	1	149.985	14.4003**
BD	3	253.809	34.8100**	3	159.367	19.1250**	3	473.585	45.4696**
BOxBD	3	12.152	1.6666	3	26.038	3.1247	3	36.108	3.4668*
Hata	16	7.291		16	8.333		16	10.415	
Genel	23			23			23		

Çizelge 4.1.'e bakıldığında, Karatay-94'de %14.2, Bülbül-89'da %13.3 ve KxB melezinde %14.6 değerleri ile her üç genotip için de kallus oluşum yüzdeleri bakımından MS_1 ortamının daha iyi sonuç verdiği belirlenmiştir.

Özcan ve ark. (2001), kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu için besin ortamlarında bulunan mineral maddeler ve vitaminlerin önemli olduğunu ve MS temel besin ortamının embriyogenesis çalışmalarında yaygın olarak kullanıldığını ifade etmişlerdir. Özgen ve ark. (2004) yaptıkları çalışmada, besin ortamı olarak temel MS besin ortamını tercih etmişler ve bu ortamda farklı orijinli arpa genotiplerinin olgun embriyolarından kallus ve rejenerant bitki elde ettiklerini bildirmişlerdir. Han ve ark., (2011) farklı arpa çeşitlerinin olgun embriyolarını kültüre aldıkları çalışmalarında, kallus oluşumuna besin ortamının etkisini araştırmışlar ve 0.5 g/l proline ve 0.5 g/l kazein hidrozilat içeren modifiye edilmiş MS (MS makro elementleri+B5 mikro elemetleri+N6 vitaminleri) ortamının tüm genotipler için optimum ortam olduğunu tespit etmişlerdir. Ganeshan ve ark. (2006), arpa, yulaf ve triticale çeşitlerinin, olgun embriyoları kültüre aldıkları çalışmalarında farklı büyüme düzenleyicileri içeren modifiye edilmiş MS ortamı (MS tuzları+B5 vitaminleri+%3 maltoz+1 g/l kazein hidrozalat+0.7 g/l proline+5 µM bakır sülfat) kullanmış ve sağlıklı kalluslar elde etmişlerdir.

Kallus oluşturma yüzdesi bakımından Karatay-94 çeşidinde %20, Bülbül-89 çeşidinde %18.3, KxB melezinde %24.2 sonuçları ile büyüme düzenleyicileri arasında en iyi sonuç dikamba içeren ortamda elde edilmiştir (Çizelge 4.1.).

Castillo ve ark. (1998), arpa çeşitlerinin olgunlaşmamış embriyolarını kullanılarak yürüttükleri rejenerasyon çalışmalarında dikambanın diğerlerine göre daha iyi sonuç verdiğini ifade etmişlerdir. Halamkova ve Ohnoutkova (2004), dikambanın 2.4-D'ye kıyasla arpa olgunlaşmamış embriyolarının kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu üzerine etkisinin daha fazla olduğunu belirlemişlerdir. Denemenin

sonuçlarına bakıldığında kullandığımız genotiplerde de dikambanın daha iyi sonuçlar verdiği ve sonuçların literatür bilgileri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Bu nedenle çalışmamızda dikamba büyüme düzenleyicisi kullanılmıştır. Bununla birlikte; çeşitli araştırıcılar 2,4-D'nin dikambadan daha etkili olduğunu ifade etmişlerdir. Serhantova ve ark. (2004) arpa çeşitlerinin çoğunda, dikamba ve piklorama göre 2.4-D içeren ortamların kallus oluşumunu ve bitki rejenerasyonu üzerine etkisinin daha iyi olduğu ve en iyi sonuçların 2,4-D içeren ortamlarda elde edildiğini ifade etmişlerdir. Özgen ve ark. (2004), farklı orijinli 15 arpa genotipinin olgun embriyolarında yürüttükleri embriyo kültürü çalışmalarında 2,4-D içeren ortamları kullanarak başarılı olmuşlardır.

Kallus ağırlığı; MS_1 ve MS_2 ortamlarının 4 farklı oksin tipinde meydana gelen kallus ağırlıkları (mg/eksplant) ait ortalama değerler Çizelge 4.3.'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Farklı arpa genotiplerinin kallus ağırlıkları (mg/eksplant)

Genotip	**Karatay-94**			**Bülbül-89**			**KxB Melezi**		
B.D. (2 mg/l)	**MS_1**	**MS_2**	**Ort.**	**MS_1**	**MS_2**	**Ort.**	**MS_1**	**MS_2**	**Ort.**
Dikamba	17.5 a	8.4 b	12.9 a	18.3 a	10.0 bc	14.1 a	16.7 b	45.0 a	30.8 a
Pikloram	10.7 b	7.3 b	9.0 bc	8.4 bc	8.3 bc	8.3 b	8.3 bc	16.7 b	12.5 b
2,4,5-T	15.1 a	7.4 b	11.3 ab	7.3 c	0.0 d	3.6 c	5.0 bc	0.0 c	2.5 b
2,4-D	14.7 a	0.0 c	7.3 c	11.1 b	9.0 bc	10.0 b	10.0 bc	13.3 bc	11.7 b
Ort.	14.5 a	5.8 b		11.3 a	6.8 b		10.0 b	18.7 a	
	$LSD_{\%1}$B.D.: 2.781 $LSD_{\%1}$B.O.x B.D.: 3.932			$LSD_{\%1}$B.D.: 2.579 $LSD_{\%1}$B.O.x B.D.: 3.647			$LSD_{\%1}$B.D.: 10.04 $LSD_{\%1}$B.O.x B.D.: 14.19		

Denemelerden elde edilen kallus ağırlıklarına ait değerler, her genotip için ayrı ayrı varyans analizine tabi tutulmuş olup besin ortamı, büyüme düzenleyicileri ve besin ortamı x büyüme düzenleyicisi interaksiyonunun kallus ağırlığına etkisi tüm genotiplerde istatistiki olarak %1 düzeyinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Farklı arpa genotiplerinin kallus ağırlığına ait varyans analiz değerleri

	Karatay-94			**Bülbül-89**			**KxB Melezi**		
VK	**SD**	**KO**	**F**	**SD**	**KO**	**F**	**SD**	**KO**	**F**
BO	1	454.984	167.3249**	1	119.693	51.1783**	1	459.410	12.9722**
BD	3	36.568	13.4483**	3	112.369	48.0465**	3	845.461	23.8730**
BOxBD	3	32.407	11.9179**	3	23.537	10.0640**	3	301.026	8.5000**
Hata	16	2.719		16	2.339		16	35.415	
Genel	23			23			23		

Çizelge 4.3.'e bakıldığında, Karatay-94'de 14.5 mg/eksplant, Bülbül-89'de 11.3 mg/eksplant değerleri ile MS_1 ortamı en iyi sonucu verirken, KxB melezinde 18.7

mg/eksplant değeriyle MS_2 ortamı en iyi sonucu vermiştir. Buradaki sonuca dayanarak aynı zamanda Sharma ve ark. (2005), tarafından yapılan araştırmada modifiye edilmiş MS (MS_2 ortamı) kullanılmış ve böylece çalışılan genotiplerin tamamında %25 ile %55 arasında kallus elde edilmiş ve bu ortamın bitki rejenerasyonu süresini kısalttığını ifade etmişlerdir. Bu nedenle yürüttüğümüz çalışmanın ilerleyen aşamalarında MS temel besin ortamından modifiye edilerek oluşturulan, MS_1 ve MS_2 kodları verilen ortamlar besin ortamı olarak kullanılmıştır.

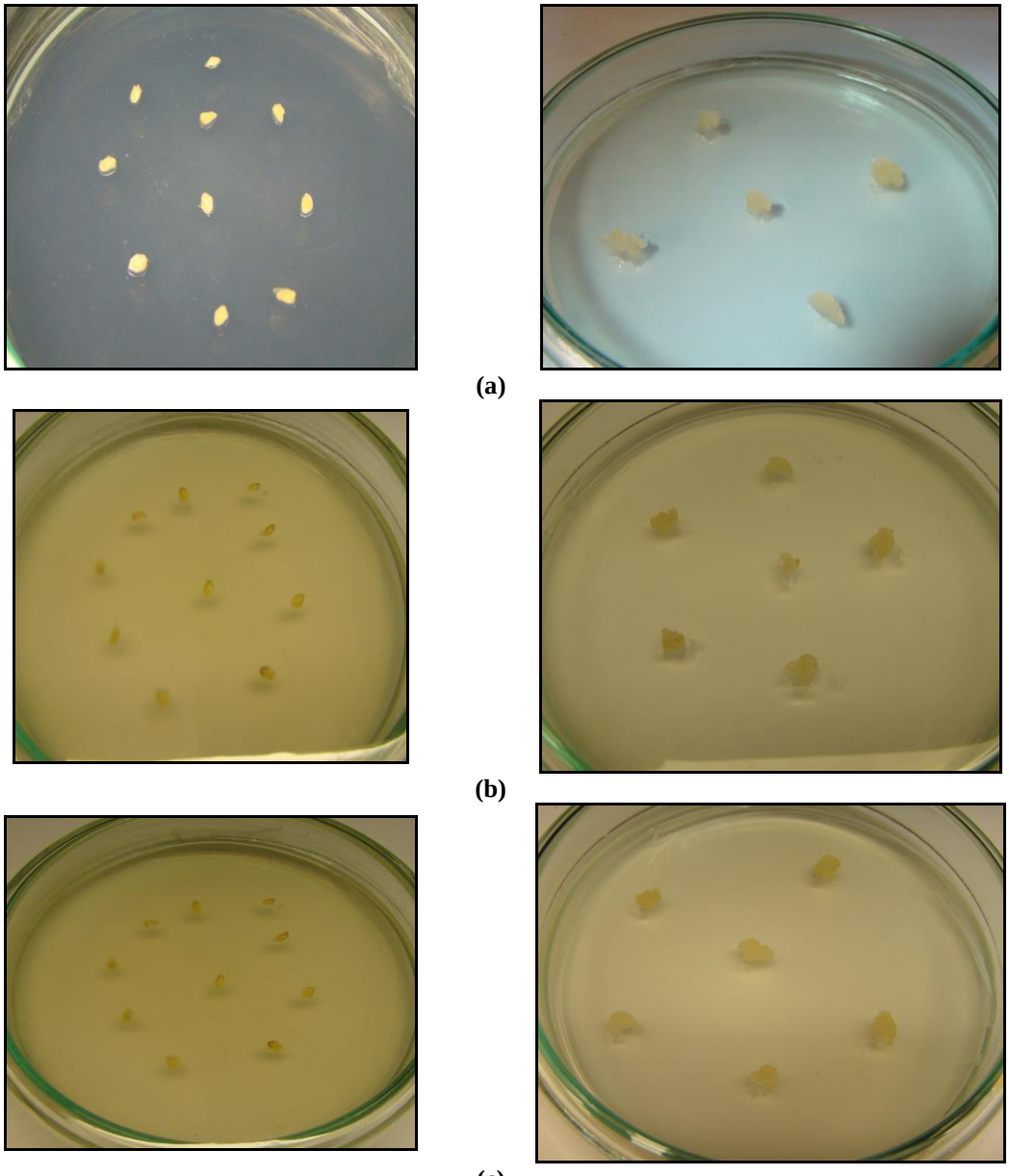
Büyüme düzenleyicilerinin kallus ağırlığına etkisine bakıldığında ise, en iyi sonuç tüm genotiplerde, Karatay-94'de 12.9 mg/ kallus, Bülbül-89'de 14.1 mg/eksplant, KxB melezinde 30.8 mg/eksplant değerleri dikamba içeren ortamlarda görülmüştür. Besin ortamı x büyüme düzenleyicisi interaksiyonuna bakıldığında en fazla kallus ağırlığı Karatay-94 için; MS_1+Dikamba (17.5 mg/eksplant), Bülbül-89 için; MS_1+Dikamba (18.3 mg/eksplant) ve KxB Melezi için; MS_2+Dikamba (45.0 mg/eksplant) ortamlarından elde edilmiştir.

Özgen ve ark. (2004) yaptıkları çalışmada, farklı orijinli arpa genotiplerinin ebeveyn ve F_1 melezlerinde olgun embriyo kültürü aracılığıyla, melez gücünün kallus ağırlığına etkisini araştırmışlar ve melez gücünün kallus ağırlığı dışındaki tüm karakterlerde olumlu etki yaptığını tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise en yüksek kallus ağırlığı KxB melez genotipinde (45.0 mg/eksplant) elde edilmiştir. Melez gücünün olumlu etkisi görülmüştür. Bu durumun ise genotip farklılığının etkisiyle ortaya çıkmış olabileceği düşünülmüştür.

En iyi sonucun tüm genotiplerde dikamba olması ve kallusların sağlıklı görünümü dikkate alınarak denemenin ileriki aşamasında dikambanın farklı konsantrasyonları kullanılmıştır. Dikambanın yanı sıra çeşitli çalışmalarda 2,4-D'nin dikambadan daha iyi sonuç verdiği ifade edildiği için 2,4-D de çalışmamızda diğer bir oksin kaynağı olarak tercih edilmiştir. Ayrıca, deneme boyunca tüm oksinlerin embriyolarda meydana getirdiği etkiler de gözlemlenmiştir. Pikloram ve 2.4.5-T oksinleri embriyolarda içgüdüsel olan çimlenme yeteneklerini engelleyememiş aksine her iki oksinde de düşük oranlarda kallus oluşumunun yanı sıra uzun sürgünler ve kısa tüysü köklenmeler meydana gelmiştir. Dikamba ve 2.4-D oksinlerini içeren ortamlarda ise böyle bir durum görülmemiş embriyonun çimlenme yeteneği kısıtlanmıştır.

4.2.2. Kallus teşvik ortamının belirlenmesi

Dikamba ve 2,4-D'nin uygun oksinler olduğu belirlendikten sonra, kallus teşviki için en uygun konsantrasyonun ve ortamın belirlenmesi amacıyla olgun embriyolar her iki oksinin 3 farklı konsantrasyonunu (2, 4, 6 mg/l) içeren MS_1 ve MS_2 ortamlarında kültüre alınmıştır (Şekil 4.3.). Kültür başlangıcından 4 hafta sonra, her üç genotipin kallus oluşum yüzdeleri (%) ve kallus ağırlıkları (mg/eksplant) belirlenmiştir (Çizelge 4.5. ve Çizelge 4.6.).



Şekil 4.3.İzole edilen embriyolar ve 4 mg/l dikamba içeren MS_1 ortamında elde edilen kalluslar (a) Karatay-94 (b) Bülbül-89 (c) KxB Melezi

Kallus oluşturma yüzdesi; MS_1 ve MS_2 ortamlarında 2 farklı oksin tipinin 3 farklı dozunda meydana gelen kallus oluşum yüzdelerine ait ortalama değerler Çizelge 4.5.'da verilmiştir. Kallus oluşum yüzdelerine ait değerler, her genotip için ayrı ayrı varyans analizine tabi tutulmuş ve sonuçlar Çizelge 4.6.'de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Farklı arpa genotiplerinin kallus oluşturma yüzdeleri (%)

		Karatay-94			**Bülbül-89**			**KxB Melezi**		
B.D.	**Doz**	**MS_1**	**MS_2**	**Ort.**	**MS_1**	**MS_2**	**Ort.**	**MS_1**	**MS_2**	**Ort.**
	2	18.9a	4.3gh	11.5a	18.8a	17.7a	18.3	17.7b	17.7b	17.7bc
Dikamba	**4**	16.6ab	8.8ef	12.7a	14.4ab	14.4ab	14.4	21.1b	10.0c	15.5bc
	6	13.3bcd	6.6fg	9.9a	15.5ab	11.1bc	13.3	20.0b	7.7c	13.8c
Ort.		16.3a	6.6b	**11.4a**	16.2a	14.4a	**15.3a**	19.6a	19.2a	**15.7b**
	2	0.0h	0.0h	0.0b	4.4d	14.4ab	9.4	20.0b	18.8b	19.4b
2,4-D	**4**	14.4bc	10.0def	12.2a	10.0bcd	7.7cd	8.9	20.0b	30.0a	25.0a
	6	8.8ef	11.1cde	10.0a	4.4d	15.5ab	10.0	17.7b	17.7b	17.7bc
Ort.		7.7 b	7.0b	**7.4b**	6.3b	12.5a	**9.4b**	11.8b	22.2a	**20.7a**
G.Ort.		12.0a	6.8b		11.3	13.5		19.4a	17.0b	
		$LSD_{\%1}$B.O.x B.D.:2.528 $LSD_{\%1}$B.D.xDOZ:3.096 $LSD_{\%1}$B.O.xB.D.xDOZ:4.378			$LSD_{\%1}$B.O.x B.D.:4.506 $LSD_{\%5}$B.O.xB.D.xDOZ:5.759			$LSD_{\%1}$B.O.x B.D.:3.683 $LSD_{\%1}$B.D.xDOZ:4.511 $LSD_{\%1}$B.O.xB.D.xDOZ:6.379		

Besin ortamının kallus oluşturma yüzdesi üzerine etkisi, Karatay-94 çeşidinde %1, KxB melezinde %5 düzeyinde önemli bulunurken, Bülbül-89 çeşidinde ise istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.6.).

Çizelge 4.5. incelendiğinde, Karatay-94 çeşidinde %12.0 ve KxB melezinde %19.4 değerleriyle MS_1 besin ortamının MS_2 ortamına göre daha iyi sonuç verdiği belirlenmiştir. Bülbül-89 çeşidinde ise MS_1 ve MS_2 ortamları arasındaki fark istatistiki olarak önemsiz çıkmıştır.

Gramineae familyasına ait türlerde, besin ortamlarının içeriğinin kallus teşviki ve bitki rejenerasyonunu etkileyen önemli faktörden biri olduğu bilinmektedir (Castillo ve ark., 1998). Embriyo kültürü ile ilgili araştırmalar incelendiğinde, pek çok araştırmacı kullandıkları ortamların besin element içeriklerini modifiye etmişler, çalıştıkları genotipe en uygun besin ortamını optimize etmeye çalışmışlardır. Arpa embriyo kültüründe besin ortamına ilave edilen, prolin, glutamin, kazein hidrozilat ve bakır sülfat kimyasallarının rejenerasyon kapasitesini artırdığı belirlenmiştir (Dahleen, 1995; Castillo ve ark., 1998; Sharma, 2005; Han ve ark., 2011). Bizim çalışmamızda da kullanılan besin ortamları bu literatürlere dayanarak modifye edilmiş ve olumlu

sonuçlar alınmıştır. Haliloğlu ve Baenziger (2005), farklı buğday genotiplerinin embriyolarını 3 farklı besin ortamında kültüre aldıkları çalışmalarında ortamın kallus oluşumunda etkili olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmamızda genotiplere bağlı olarak en iyi sonuç veren besin ortamının farklılık gösterdiği sonucu ile çeşitli araştırıcıların daha önce yaptıkları araştırma sonuçları örtüşmektedir.

Büyüme düzenleyicilerinin ve besin ortamı x büyüme düzenleyicileri interaksiyonunun kallus oluşturma yüzdesi üzerine etkilerinin tüm genotiplerde %1 düzeyinde önemli olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.6.).

Büyüme düzenleyicilerinin kallus oluşturma yüzdesine etkileri değerlendirildiğinde, Karatay-94 çeşidinde %11.4 ve Bülbül-89 çeşidinde %15.3 değerleri ile en iyi sonucu veren büyüme düzenleyicisi dikamba olurken, KxB melezinde en iyi sonuç %20.7 değeri ile 2.4-D'den elde edilmiştir.

Halamkova ve Ohnoutkova, (2004) farklı arpa genotiplerinin embriyolarını, farklı oksin içeren ortamlarda kültüre almışlar ve dikambanın, kallus oluşumu ve rejenerasyon sıklığı açısından 2.4-D'ye kıyasla daha uygun olduğunu bildirmişlerdir. Bunun aksine ise, Serhantova ve ark. (2004), farklı arpa çeşitlerinde, üç farklı oksin (dikamba, pikloram, 2.4-D) tipinin, kallus teşviki ve sonrasında rejenerasyon kapasitesine etkisini araştırdıkları çalışmalarında 2.4-D içeren ortamlarda dikamba ve pikloram içeren ortamlara kıyasla en yüksek ortalamada kallus oluşumu elde ettiklerini bildirmişlerdir. Popelka ve Altpeter (2001), kendilenmiş üç çavdar hattının olgunlaşmamış embriyolarıyla yürüttükleri çalışmada kallus oluşunu üzerine büyüme düzenleyicilerinin farklı etkiler yaptığını, 2,4-D içeren ortamın dikamba ve pikloram içeren ortamdan daha önemli olduğunu bildirmişlerdir.

Besin ortamı x büyüme düzenleyicisi interaksiyonuna bakıldığında en fazla kallus oluşum yüzdesi Karatay-94 için; MS_1+dikamba (%16.3), Bülbül-89 için; MS_1+dikamba (%16.2) ve KxB Melezi için; MS_1+dikamba (19.6a) ile istatistiki olarak aynı grupta yer almakla birlikte MS_2+2.4-D (%22.2a) ortamlarından elde edilmiştir.

Zapata ve ark. (2004), olgun arpa embriyolarını farklı büyüme düzenleyicilerinin kombinasyonları ile besin element içerikleri birbirinden farklı 4 ortamda kültüre almışlar ve araştırma sonuçlarına göre en fazla kallus oluşumunu %75.5 değeri ile 2 mg/l 2.4-D içeren J25-8 ortamında elde ederken, aynı konsantrasyonda 2.4-D içeren MS ortamında bu değerin %35'e düştüğünü bu nedenle ortam ve büyüme düzenleyicilerin birlikte etkili olduğunu ifade etmişlerdir. Araştırmamızda da besin ortam x büyüme düzenleyicisi interaksiyonun etkili olduğu görülmektedir. Bu nedenle her genotip için

ortam ve büyüme düzenleyicisi etkilerinin değişebileceği, protokoller geliştirilirken bu noktaya dikkat edilmesi gerektiği söylenebilir.

Büyüme düzenleyicisi x doz interaksiyonunun kallus oluşturma yüzdesi üzerine etkisi, Karatay-94 çeşidi ile KxB melezinde %1 düzeyinde önemli bulunurken, Bülbül-89 çeşidinde istatistiki olarak önemsiz olduğu belirlenmiştir. Besin ortamı x büyüme düzenleyicisi x doz interaksiyonu ise Karatay-94 çeşidi ile KxB melezinde %1 seviyesinde, Bülbül-89 çeşidinde ise %5 seviyesinde önemli bulunmuştur.

Büyüme düzenleyicisi x doz interaksiyonu yorumlandığında ise, Karatay-94 çeşidinde 4 mg/l dikamba, KxB melezinde ise 4 mg/l 2.4-D içeren ortamların daha iyi sonuç verdiği belirlenmiştir.

Buğday, arpa, triticale üzerinde çalışan Przetakiewicz ve ark. (2003), üç farklı oksin tipinin (2,4-D, dikamba, pikloram) 3 mg/l dozlarını ve kombinasyonlarını (1 mg/l pikloram + 1 mg/l 2,4-D; 1.5 mg/l pikloram + 1.5 mg/l dikamba; 1.5 mg/l pikloram +1.5 mg/2,4-D; 1.5 mg/l dikamba+1.5 mg/l 2,4-D) kullanarak kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu üzerine etkisini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda uygun oksin tipinin ve dozunun genotipe göre değiştiğini saptamışlardır. Özgen ve ark. (2004), farklı orijinli 15 arpa genotipinin olgun embriyolarında yürüttükleri embriyo kültürü çalışmalarında, 3 mg/l 2.4-D içeren ortamları kullanarak başarılı olmuşlardır. Vitanova ve ark. (1994), arpada farklı 2,4-D konsantrasyonlarının hem kallus oluşumu hem de bitki rejenerasyonu üzerine etkisini araştırmışlar, 10 mg/l 2,4-D'nin olumlu etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Gürel ve ark. (2009) farklı arpa genotiplerinde, 2.4-D ve dikambanın farklı konsantrasyonlarının kallus oluşumu üzerine etkilerini araştırmışlar ve 4 mg/l dikambanın en iyi sonucu verdiğini ifade etmişlerdir. Ren ve ark. (2010) farklı buğday genotiplerinin olgun embriyolarını, farklı dikamba konsantrasyonlarını içeren ortamlarda kültüre almışlar ve 4 mg/l dikambanın en iyi sonucu verdiğini bildirmişlerdir. Sonuçların genotip ve dikamba konsantrasyonundan büyük oranda etkilendiğini tespit etmişlerdir. Araştırmalardan da anlaşılacağı gibi, uygun oksin tipi ve dozu genotipe bağlı olarak değişlik göstermektedir, nitekim bizim sonuçlarımızda bu sonucu doğrular niteliktedir.

Son olarak, besin ortamı x büyüme düzenleyicisi x doz interaksiyonuna bakıldığında, en fazla kallus oluşturma yüzdesi Karatay-94 için; MS_1+ 2 mg/l dikamba (%18.9), Bülbül-89 için; MS_1+ 2 mg/l dikamba (%18.8) ve KxB Melezi için; MS_2+4 mg/l 2.4-D (%30.0) ortamlarından elde edilmiştir.

Sharma ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada farklı arpa çeşitlerinin olgun embriyolarını, modifiye edilmiş MS ortamında (MS_2) kültüre aldıkları çalışmalarında, kallus oluşumu için 2.4-D farklı konsantrasyonlarda kombinasyonlarını denemişler, kallus oluşum oranlarına bakıldığında, 6 mg/l 2.4-D içeren ortam en iyi sonucu elde etmişlerdir. Araştırmamızda ise genotipe bağlı olarak en uygun ortam, büyüme düzenleyicisi ve dozun değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. Bu durum genotipik farklılığın belirleyici özellik olduğu ve genotipe göre bu üçlü interaksiyonun değişebileceği şeklinde açıklanabilir. Dolayısıyla Bregitzer ve ark., (1998)'nın da ifade ettiği gibi her genotip için rejenerasyon protokollerinin geliştirilmesi ve kullanılması önerilmektedir.

Çizelge 4.6. Farklı arpa genotiplerinin kallus oluşturma yüzdelerine ait varyans analiz değerleri

	Karatay-94			**Bülbül-89**			**K x B Melezi**		
VK	**SD**	**KO**	**F**	**SD**	**KO**	**F**	**SD**	**KO**	**F**
BO (A)	1	243.048	66.1207**	1	44.438	3.8051	1	52.562	6.7359*
BD (B)	1	146.628	39.8898**	1	314.453	26.9256**	1	225.500	28.8979**
BO x BD (A*B)	1	180.723	49.1654**	1	148.016	12.6741**	1	259.747	33.2867**
DOZ (C)	2	273.649	37.2228**	2	19.657	1.6831	2	61.063	7.8253**
A*C	2	42.098	5.7263**	2	26.185	2.2421	2	30.803	3.9475*
B*C	2	256.710	34.9187**	2	23.283	1.9936	2	48.074	6.1608**
A*B*C	2	47.152	6.4138**	2	64.318	5.5073*	2	94.768	12.1445**
Hata	24	88.220		24	11.679		24	7.803	
Genel	35			35			35		

Kallus ağırlığı; MS_1 ve MS_2 ortamlarında 2 farklı oksin tipinin 3 farklı dozunda meydana gelen kallus ağırlıklarına ait ortalama değerler Çizelge 4.7.'de verilmiştir.

Denemelerden elde edilen kallus ağırlıklarına ait değerler, her genotip için ayrı ayrı varyans analizine tabi tutulmuş ve Çizelge 4.8.'de verilmiştir. İlgili çizelgeden görüleceği gibi, besin ortamının, büyüme düzenleyicilerinin, besin ortamı x büyüme düzenleyicileri interaksiyonunun kallus ağırlığı üzerine etkisi, her üç genotipte de %1 düzeyinde önemli bulunmuştur. Büyüme düzenleyicisi x doz interaksiyonunun kallus ağırlığı üzerine etkisi ise, Karatay-94 çeşidinde %5, Bülbül-89 çeşidinde %1 düzeyinde önemli bulunurken, KxB melezinde istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur. Son olarak, besin ortamı x büyüme düzenleyicisi x doz interaksiyonunun kallus ağırlığına etkisi

incelendiğinde, Karatay-94 ile Bülbül- 89 çeşitlerinde %1 seviyesinde, KxB melezinde ise %5 seviyesinde önemli bulunmuştur.

Çizelge 4.7. Farklı arpa genotiplerinin kallus ağırlıkları (mg/eksplant)

		Karatay-94			**Bülbül-89**			**K x B Melezi**		
B.D.	**Doz**	**MS_1**	**MS_2**	**Ort.**	**MS_1**	**MS_2**	**Ort.**	**MS_1**	**MS_2**	**Ort.**
	2	19.5b	7.2cd	13.3b	28.9b	24.7b	26.8a	24.4bc	15.5e	20.0
Dikamba	**4**	15.3bc	8.0cd	11.6b	8.4cd	17.7bc	13.1b	22.2bcd	18.9de	20.5
	6	39.1a	6.6cd	22.8a	46.3a	6.6d	26.5a	30.0a	6.6f	18.3
Ortalama		24.6a	7.3b	**15.6a**	28.0a	16.4b	**22.1a**	25.5a	13.7b	**19.6b**
	2	0.0d	0.0d	0.0c	1.1d	6.2d	3.7c	23.3bcd	22.2bcd	22.7
2,4-D	**4**	14.1bc	7.7cd	10.9b	8.1cd	4.4d	6.2bc	20.0cde	26.6ab	23.3
	6	6.0cd	19.6b	12.8b	1.6d	2.5d	2.1c	24.4bc	22.2bcd	23.3
Ort.		6.6b	9.1b	**8.2b**	3.6c	4.4c	**4.0b**	22.6a	23.7a	**23.1a**
G.Ort.		15.6a	8.2b		15.8a	10.4b		24.1a	18.7b	
		$LSD_{\%1}$B.O.x B.D:6.650 $LSD_{\%5}$B.D.xDOZ:6.010 $LSD_{\%1}$B.O.xB.D.xDOZ:11.52			$LSD_{\%1}$B.O.x B.D:6.144 $LSD_{\%1}$B.D.xDOZ:7.524 $LSD_{\%1}$B.O.xB.D.xDOZ:10.64			$LSD_{\%1}$B.O.x B.D:3.858 $LSD_{\%5}$B.O.xB.D.xDOZ:4.931		

Çizelge 4.8. Farklı arpa genotiplerinin kallus ağırlıklarına ait varyans analiz değerleri

	Karatay-94			**Bülbül-89**			**K x B Melezi**		
VK	**SD**	**KO**	**F**	**SD**	**KO**	**F**	**SD**	**KO**	**F**
BO (A)	1	499.523	19.6349**	1	260.301	11.9888**	1	261.361	30.5239**
BD (B)	1	581.565	22.8598**	1	2959.306	136.2988**	1	11.654	13.0399**
BOxBD (A*B)	1	881.100	34.6337**	1	342.231	15.7624**	1	378.951	44.2571**
DOZ (C)	2	376.870	14.8137**	2	107.166	4.9358*	2	3.799	0.4436
A*C	2	8.743	0.3437	2	448.591	20.6611**	2	156.914	18.3257**
B*C	2	128.785	5.0622*	2	287.619	13.2471**	2	4.914	0.5739
A*B*C	2	413.488	16.2531**	2	542.955	25.0073**	2	38.935	4.5472*
Hata	24	25.441		24	21.712		24	8.563	
Genel	35			35			35		

Çizelge 4.7. incelendiğinde, Karatay-94 çeşidinde 15.6 mg/eksplant, Bülbül-89 çeşidinde 15.8 mg/eksplant, KxB melezinde ise 24.1 mg/eksplant değerleriyle MS_1 besin ortamı en iyi sonucu vermiştir.

Ren ve ark. (2010) farklı buğday genotiplerinin olgun embriyolarını, farklı besin ortamlarında kültüre almışlar ve besin ortamının kallus ağırlığını büyük oranda etkilediğini tespit etmişlerdir.

Büyüme düzenleyicileri her üç genotipte kıyaslandığında, Karatay-94 çeşidinde (15.6 mg/eksplant) ve Bülbül-89 çeşidinde (22.1 mg/eksplant) dikamba en iyi sonucu verirken, KxB melezinde (23.1 mg/eksplant) 2.4-D en iyi sonucu vermiştir.

Mendoza ve Kaepler (2002), buğday olgun embriyolarında, 4 farklı oksin tipinin 2,4-D, dikamba, pikloram ve 2-MCPP [2-(2-metil-4-klorofenoksil) propiyonik asit] farklı konstrasyonlarının kallus ağırlığı üzerine olan etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, oksin tipinin, kallus ağırlığına etkisinin önemli olduğunu belirlemişlerdir. Pikloram ve dikamba konsantrasyonunun artması kallus ağırlığını artırmış, buna karşın 2,4-D konsantrasyonunun artması kallus ağırlığını azaltmıştır. Bunun aksine, Çabuk (2010) farklı mısır genotiplerinin olgun embriyolarını, farklı konsantrasyonlarda 2.4-D içeren ortamlarda kültüre aldığı çalışmasında, kallus ağırlığının genotipe göre değiştiğini bununla birlikte 2 mg/l ve 4 mg/l konsantrasyonlarında en iyi sonucu elde ettiğini bildirmiştir.

Besin ortamı x büyüme düzenleyicisi interaksiyonuna bakıldığında en fazla kallus ağırlığı Karatay-94 için; MS_1+Dikamba (24.6 mg/eksplant), Bülbül-89 için; MS_1+Dikamba (28.0 mg/eksplant) ve KxB Melezi için; MS_1+Dikamba (25.5 mg/eksplant) ortamlarından elde edilmiştir. Büyüme düzenleyicisi x doz interaksiyonu yorumlandığında ise, Karatay-94 çeşidinde 6 mg/l dikamba (22.8 mg/eksplant), Bülbül-89 çeşidinde 6 mg/l dikamba (26.5 mg/eksplant) KxB melezinde ise 4 mg/l 2.4-D (23.3 mg/explant) dozlarının daha iyi sonuç verdiği belirlenmiştir.

Son olarak, besin ortamı x büyüme düzenleyicisi x doz interaksiyonuna bakıldığında en fazla kallus ağırlığı Karatay-94 için 39.1 mg/eksplant, Bülbül-89 için 46.3 mg/eksplant, KxB Melezi için, 30.0 mg/eksplant olmak üzere tüm genotiplerde MS_1+ 6 mg/l dikamba ortamından elde edilmiştir. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde, bizim çalıştığımız genotipler için kallus ağırlığını olumlu yönde etkileyen büyüme düzenleyicisi dikamba olurken, besin ortamı ise MS_1 ortamı olmuştur.

4.2.3. Sürgün teşvik ortamının belirlenmesi

Kallus teşvik ortamlarında elde edilen kalluslar, sürgün oluşumunun teşvik edilebilmesi için TDZ ya da BAP sitokininlerinden birini içeren MS_1 besin ortamında alt kültüre alınmıştır. Araştırmamızın genelinde, MS_1 ortamının daha iyi oranda yanıt vermesinden dolayı çalışmanın bu aşamasına sadece MS_1 ortamı ile devam edilmiştir. Kültüre başlangıcından 4 hafta sonra, sürgün gelişim yüzdeleri alınmıştır (Çizelge 4.9.).

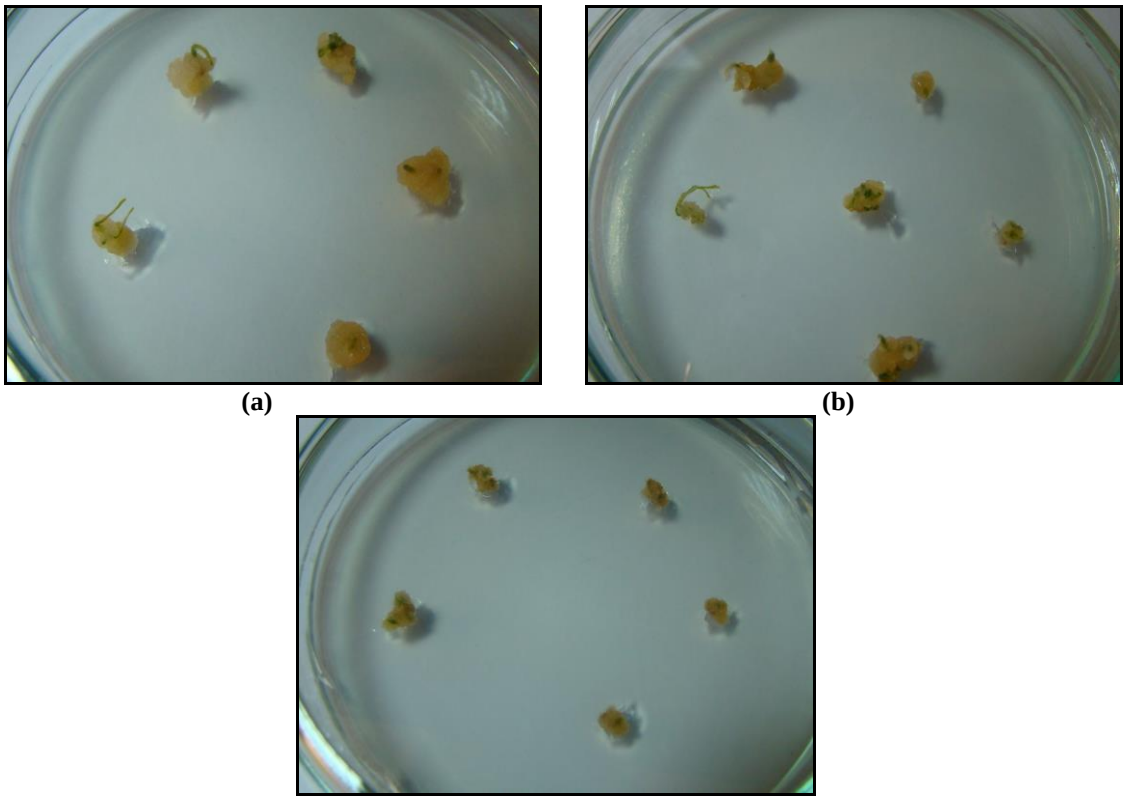
Çizelge 4.9. Farklı arpa genotiplerinin sürgün gelişim yüzdeleri (%)

Kallus Oluşturma Ortamı		Sürgün Geliştirme Ortamı					
B.D.	**Doz (mg/l)**	**Kontrol**	**0.2 mg/l TDZ**	**0.5 mg/l TDZ**	**0.5 mg/l BAP**	**1 mg/l BAP**	**Ort.**
Karatay-94							
Dikamba	2	0.0d	0.0d	0.0d	0.0d	0.0d	0.0c
	4	0.0d	13.3bc	13.3bc	20.0b	86.6a	26.7a
	6	0.0d	0.0d	0.0d	0.0d	13.3bc	2.7c
Ortalama		0.0c	4.4bc	4.4bc	6.6b	33.3a	**9.8a**
2,4-D	2	0.0d	0.0d	0.0d	0.0d	0.0d	0.0c
	4	0.0d	13.3bc	0.0d	20.0b	6.6cd	8.0b
	6	0.0d	0.0d	0.0d	0.0d	0.0d	0.0c
Ortalama		0.0c	4.4bc	0.0c	6.6b	2.2bc	**2.7b**
				$LSD_{\%1}$B.D.xDOZ:5.016 $LSD_{\%1}$B.D.xS.O.:6.476 $LSD_{\%1}$B.D.xDOZxS.O.:11.22			
Bülbül-89							
Dikamba	2	0.0d	0.0d	0.0d	0.0d	0.0d	0.0
	4	0.0d	0.0d	0.0d	13.3bc	26.6a	8.0
	6	0.0d	0.0d	0.0d	0.0d	13.3bc	2.6
Ortalama		0.0c	0.0c	0.0c	4.4bc	13.3a	**3.5a**
2,4-D	2	0.0d	0.0d	0.0d	0.0d	0.0d	0.0
	4	0.0d	0.0d	0.0d	6.6cd	20.0ab	5.3
	6	0.0d	0.0d	0.0d	0.0d	0.0d	0.0
Ortalama		0.0c	0.0c	0.0c	2.2bc	6.6b	**1.8b**
				$LSD_{\%1}$B.D.xS.O.:5.287 $LSD_{\%1}$B.D.xDOZxS.O.:9.158			
K x B Melezi							
Dikamba	2	0.0e	0.0e	0.0e	0.0e	0.0e	0.0d
	4	0.0e	20.0bc	20.0bc	26.6b	100.0a	33.3a
	6	0.0e	0.0e	0.0e	13.3cd	20.0bc	6.6c
Ortalama		0.0d	6.6c	6.6c	13.3b	40.0a	**13.3a**
2,4-D	2	0.0e	0.0e	0.0e	0.0e	0.0e	0.0d
	4	0.0e	6.6de	6.6de	20.0bc	26.6b	12.0b
	6	0.0e	0.0e	0.0e	0.0e	26.6b	5.3c
Ortalama		0.0d	2.2cd	2.2cd	6.6c	17.7b	**5.7b**
				$LSD_{\%1}$B.D.xDOZ:5.016 $LSD_{\%1}$B.D.xS.O.:6.476 $LSD_{\%1}$B.D.xDOZxS.O.:11.22			

Denemelerden elde edilen sürgün oluşum yüzdelerine ait değerler, her genotip için ayrı ayrı varyans analizine tabi tutulmuş olup, Karatay-94 çeşidi ve KxB melezinde tüm faktörlerin sürgün geliştirme yüzdesi üzerine etkileri %1 düzeyinde önemli bulunmuştur. Bülbül-89 çeşidinde ise besin ortamı x büyüme düzenleyicisi, besin ortamı x büyüme düzenleyici x doz interaksiyonları istatistiki olarak önemsiz bulunurken, diğer faktörler %1 düzeyinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.10.).

Çizelge 4.9. incelendiğinde, kallusların geldiği ortamdaki büyüme düzenleyicisinin sürgün gelişiminde büyük oranda etkili olduğu görülmüştür.4 mg/l 2.4-D ve 4 mg/l dikamba içeren ortamlardan gelen kalluslarda sürgün gelişimi daha yüksek oranda meydana gelmiştir. Bu iki büyüme düzenleyicisi kıyaslandığında ise tüm genotiplerde dikamba içeren ortamlardan gelen kalluslarda daha yüksek oranda sürgün gelişimi olmuştur. Ahmet ve Adak (2007), Irak orijinli farklı buğday çeşitlerinin olgun embriyolarını kültüre aldıkları çalışmalarında, kallus ağırlığı ile kallustan oluşan rejenerant bitki sayısı arasında ilişki olduğunu tespit etmişler ve kallus ağırlığının artmasıyla rejenerasyon yeteneğinin de arttığını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da en yüksek kallus ağırlıkları genel anlamda değerlendirildiğinde dikamba büyüme düzenleyicisini içeren ortamlarda elde edilmiş olup sonucumuz bilgiyi doğrular niteliktedir.

Tüm genotiplerde sürgün gelişimini en fazla teşvik eden büyüme düzenleyicisi 1 mg/l BAP olmuştur.1 mg/l BAP içeren ortamda, tüm genotiplerde sürgün gelişimin başlangıcında olan kallusların görüntüsü Şekil 4.4.'de verilmiştir.



Şekil 4.4. 1 mg/l BAP içeren ortamlarda sürgün gelişiminin başlangıcında olan kalluslar (a) Karatay-94 (b) KxB melezi (c) Bülbül-89

Genotiplerin sürgün oluşturma yüzdeleri arasında da büyük farklar bulunmaktadır. Genotipler arasında KxB (%13.3) melezinde en yüksek sürgün oluşumu sağlanırken, Bülbül-89 (%1.8) çeşidinde en düşük oranda sürgün gelişimi sağlanmıştır. Bu durumun, genotiplerin rejenerasyon kapasitesinin farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Embriyo kültürü ile ilgili yapılan araştırmalar incelendiğinde, kallustan sürgün teşvikinin sağlanabilmesi için farklı araştırıcılar tarafından farklı büyüme düzenleyicileri ve kombinasyonları tercih edilmiştir. Sharma ve ark. (2005), farklı arpa genotiplerinin olgun embriyolarını kültüre aldıkları çalışmada, elde ettikleri kalluslardan sürgün oluşumu için BAP ve TDZ büyüme düzenleyicilerinin farklı kombinasyonlarını denemişler ve düşük orandaki BAP'ı oldukça etkili bulmuşlardır. Shan ve ark. (2000) ise, arpa olgunlaşmamış embriyolarında *in vitro* rejenerasyonu araştırdıkları çalışmada, 1 mg/l TDZ'nin rejenerasyonu artırdığını ve kallustan sürgün rejenerayonunu sağladığını tespit etmişlerdir. Ganeshan ve ark. (2006), TDZ ve/veya BAP büyüme düzenleyicilerini içeren besin ortamlarında, sürgün gelişimi için farklı arpa çeşitlerinin olgun embriyolarını kültüre almışlar ve en iyi sonucu, iki sıralı arpa genotipinde 1 mg/l TDZ+1 mg/l BAP, altı sıralı arpa genotipinde ise 1 mg/l TDZ+2 mg/l BAP içeren

ortamda elde etmişlerdir. Bunların aksine, Gubisova ve ark. (2012) büyüme düzenleyicilerinin (BAP ya da TDZ) olgun embriyo kültüründe, sürgün oluşumuna etkisini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, 0.1 mg/l ya da 1 mg/l konstransyonlarda TDZ ve BAP içeren rejenerasyon ortamlarında sürgün oluşum etkinliği açısından istatistiksel bir farklılık elde edememiştirler. Bu sonuçlar, kullanılan büyüme düzenleyicisi ve dozu kadar çalışılan genotipin rejenerasyon kapasitesininde önemli olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.10. Farklı arpa genotiplerinin sürgün gelişim yüzdelerine ait varyans analiz değerleri

	Karatay-94			Bülbül-89			K x B Melezi		
VK	**SD**	**KO**	**F**	**SD**	**KO**	**F**	**SD**	**KO**	**F**
BD(A)	1	1137.735	42.6686**	1	71.106	4.0000**	1	1284.399	48.1674**
DOZ (B)	2	2791.943	104.6691**	2	373.300	20.9997**	2	4137.544	155.1657**
BDxDOZ (A*B)	2	764.426	28.6684**	2	17.776	1.0000	2	1071.090	40.1679**
SO (C)	4	862.194	32.3350**	4	339.970	19.1247**	4	2328.792	87.3340**
A*C	4	826.644	31.0017**	4	37.775	2.1250**	4	328.892	12.3341**
B*C	8	568.876	21.3346**	8	173.318	9.7499**	8	898.868	33.7092**
A*B*C	8	519.995	19.5014**	8	17.776	1.0000	8	532.221	19.9593**
Hata	60	26.664		60	17.776		60	26.665	
Genel	89			89			89		

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Çalışmanın anter kültürü kısmında, farklı arpa genotipleri laboratuvar şartlarında yetiştirilerek, uygun mikrospor aşamasındaki başakların morfolojileri belirlenmiştir. Uygun görüntüdeki başaklar hasat edilmiş ve anterleri kültüre alınmıştır. Arpa anter kültüründe stres ön uygulamalarının etkinliği artırmasından dolayı, hasat edilen başaklar 0, 4, 21, 28 gün boyunca 4°C'de soğuk ön işleme tabi tutulmuş ve ardından farklı ön uygulamaya ortamlarına aktarılmıştır. Besin ortamı olarak arpa anter kültürü için geliştirilmiş üç farklı besin ortamı (FHG, BAC3, C3) kullanılmıştır. Böylece çalışılan genotipler için uygun besin ortamının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu araştırmadan elde edilen sonuçlar şu şekilde sıralanabilir;

İklim şartlarına bağlı kalınmadan laboratuvar şartlarında bitkiler yetiştirilmiş, vernalizasyon ihtiyacı karşılanmış ve canlı anterler elde edilmiştir. Böylece çalışmaların sürekliliği ve kesintiye uğramaması sağlanmıştır. Normal şartlarda 1 yılda ve belirli bir dönemde anter temin edilebilirken yaptığımız çalışmada, istediğimiz zaman ve dönemde bunun elde edilebilme imkânı ortaya konmuştur.

Laboratuvar şartlarında yetiştirilen bitkilerin anterleri kültür ortamına alınmadan önce, mikrosporların gelişme dönemi olarak yaklaşık tek çekirdekli oldukları dönem mikroskopta belirlenmiş ve başakların morfolojik tanımlaması yapılmıştır.

Çalışmada kullanılan ortamlar, büyüme düzenleyicileri ve ön uygulamalardan başarı sağlanamamıştır. Ancak arpa anter kültürü ve döllenme biyolojisi hakkında bundan sonraki çalışmalar için bilgi birikimi ve tecrübe kazanılmıştır.

Araştırmanın embriyo kültürü kısmında, farklı arpa genotiplerinin (Kartay-94, Bülbül-89, KxB melezi) olgun embriyoları kullanılarak, kallus oluşumu üzerine, besin ortamının (MS_1 ve MS_2), oksin tipinin (2,4-D, dikamba, pikloram ve 2.4.5-T), ve dozlarının (2, 4, 6 mg/l), yeşil bitki rejenerasyonu üzerine ise sitokinin tipinin (TDZ, BAP) ve dozlarının (0.2, 0.5, 1 mg/l) etkileri incelenmiştir. Tüm genotiplerde kallus ve sürgün oluşumu sağlanmıştır. Araştırmanın sonunda, çalışılan genotipler için uygun besin ortamı, uygun oksin tipi ve dozu tespit edilmiştir. Bu araştırmadan elde edilen sonuçlar şu şekilde sıralanabilir;

Oksin tipinin, oksin dozlarının ve besin ortamının kallus ve sürgün oluşum kapasitesine olan etkisi önemli bulunmuştur.

Kallus ve sürgün oluşum yüzdesi bakımından en yüksek değere KxB genotipi, kallus ağırlığı bakımından en yüksek değere Bülbül-89 çeşidi sahip olmuştur.

Kallus oluşumu ve kallus ağırlığı yönünden besin ortamları arasında MS_1 ortamı en iyi sonuç veren ortam olmuştur.

Büyüme düzenleyicileri arasında, kallus oluşum oranı ve kallus ağırlığı açısından, çeşitlerde dikamba daha etkili olurken, melezde 2.4-D daha iyi sonuç vermiştir.

Sürgün oluşum yönünden değerlendirildiğinde ise, en iyi sonuç tüm genotiplerde 1 mg/l BAP içeren ortamda elde edilmiştir. Sürgün oluşumunda, kallusların alt kültüre alındığı ortam kadar oluştuğu ortamında önem teşkil ettiği belirlenmiştir. 4 mg/l dikamba ve 4 mg/l 2.4-D içeren ortamlardan gelen kalluslarda sürgün oluşum yüzdesi artmıştır.

Bu araştırmadan elde edilen bulgulara dayanarak genotipe göre değişmekle beraber genel olarak, besin ortamı MS_1'in, kallus gelişimi için oksin tipi ve dozu olarak 4 mg/l dikambanın, sürgün gelişimi için sitokinin tipi ve dozu olarak 1 mg/l BAP'ın kullanılması uygun bulunmuştur.

5.2. Öneriler

Haploid bitki elde etmek için yapılan çalışmalarda donör bitkilerin yetişme dönemi ve şartlarının iyi ayarlanması, senkronize bir gelişme imkânının yaratılması gerektiği önerilmektedir.

Çalışmada, tek çekirdekli mikrosporları içeren başakların morfolojisi tespit edilmiştir. Yine de genotipe ve çevresel şartlara göre değişen morfolojik karakterlere güvenmeden, her çalışma öncesinde sitolojik bir gözlem yapılması önerilmektedir.

Tüm dünyada anter kültürü çalışmalarında model bitki olarak belirlenmiş, anter kültürüne yanıtı yüksek oranlarda gerçekleşen *Hordeum vulgare* var. Igri çeşidi ile kıyaslamalı çalışmalar yapılmalı, özellikle ülkemize özgü yerel çeşitlerin anter kültürüne uygunluğunun belirlenmesi için bu çeşit, çalışmalarda model bitki olarak tercih edilmelidir.

Anter kültürünü etkileyen faktörler arasında genotip başta gelmektedir. Pek çok araştırma tarafından da bu bulgu desteklenmiştir. Bu sebeple genotipe bağlı uygun anter kültürü ortamlarının ve kültür şartlarının optimize edilmesi önerilmektedir.

Olgun embriyodan embriyo kültürü yapılan bu çalışmada, kallus oluşumu, kallus ağırlığı ve sürgün oluşumu bakımından önemli bulgular elde edilmiştir. Ancak rejenerasyon kapasitesi olgunlaşmamış embriyoların kullanıldığı çalışmalara göre daha düşük kalmaktadır. Bu nedenle rejenerasyon kapasitesinin iyileştirilmesine yönelik çalışmaların yapılmasının yararlı olacağı düşünülmektedir. Ayrıca ülkemize özgü yerel genotiplerin araştırılacağı çalışmalarda, embriyo kültürüne yanıtı yüksek Golden Promise çeşidi model bitki olarak seçilmeli bu çeşit ile kıyaslamalı olarak çalışılması uygun olacaktır.

Arpada, bitki rejenerasyon protokolleri, büyük oranda genotipe bağlılık göstermektedir. Seçkin arpa genotiplerinde, genotipe bağlı tekrarlanabilen rejenerasyon protokollerinin oluşturulması, biyoteknolojik çalışmaların devamlılığı açısından mutlak gereklidir ve büyük kolaylıklar sağlamaktadır.

KAYNAKLAR

Abak, K., 1986. Biber Islahında Anter Kültüründen Yararlanma, *TÜBITAK Bitki Islahı Sempozyumu Bildiri Özetleri*, İzmir, 64.

Abebe, D. Z, Teffera W. ve Machuka J.S., 2008, Regeneration of tropical maize lines (*Zea mays* L.*)* from mature zygotic embryo through callus initiation, *African Journal of Biotechnology*, 7 (13): 2181-2186.

Ahmet, H., Adak. M., 2007, Irak'ta yetiştirilen bazı ekmeklil buğday çeşitlerinde kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu, *Tarım Bilimler Dergisi*, 133) 285-292

Akula, C., Akula, A., Henry, R., 1999, Improved regeneration efficiency from mature embryos of barley cultivars. *Biol Plant*, 42(4):505–513.

Altamura, M. M., Cercosimo, A., Majoli, C., Crespan, M., 1992. Histological Study of Embriyogenesis from Anthers of *Vitis rupestris In vitro*. Protoplazma 171, 134-141.

Arı, E., 2006, Türkiye'de Doğal Olarak Yetişen *Anemone coronaria* var. *coccinea*'da Anter Kültürü Çalışmaları, Doktora Tezi, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,* Adana, 1-169.

Bajaj, Y. P. S., 1983, Handbook of Plant Cell Culture :In Vitro Production of Haploids, Vol.1, D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato, Y. Yamada, *Macmillan Publishing Company New York*, s. 228-287.

Bankina B., Gaile Z., 2009, Evaluation of barley disease development depending on varieties, *Agronomy Res*., 7: 198–203

Barro, F., Martin, A., Lazzeri, P. A., Barcelo, P., 1999, Medium optimization for efficient somatic embryogenesis and plant regeneration from immature inflorescences and immature scutella of elite cultivars of wheat, barley and tridordeum, *Euphytica*, 108, 161–167.

Bartok, T., Sagi, F., 1990, A new endosperm supported callus induction method for wheat (*T. aestivum*), *Plant Cell Tissue Organ Cult*., 21: 37-41.

Binott, J., Songa, J., Inında, J., Njagı, E., Machuka, J., 2008, Plant regeneration from immature embryos of Kenyan maize inbred lines and their respective single cross hybrids through somatic embryogenesis., *African Journal of Biotechnology*, 7(8): 981-987.

Birsin, M. A., Önde, S. and Özgen, M., 2001, Callus induction and plant regeneration from mature embryos of oat, *Turk J. Biol.*, 25, 427-434.

Birsin, M., Özgen, M., 2004, A comparison of callus induction and plant regeneration from different embryo explant of Triticale, *Cellular & Molecular Biology Letters*, 9, 353–361.

Blakeslee A. F., Belling J., Farnham M.E., Bergner A.D., 1922, A haploid mutant in the Jimson weed, Datura stramonium, *Science*, 55:646–647

Bouamama, B., Salem, A.B., Youssef, F.B., Chaieb S., Jaafoura, M.H., Mliki, A., Ghorbel, A., 2011, Somatic Embryogenesis And Organogenesis From Mature Caryopses Of North African Barley Accession "Kerkena" (Hordeum vulgare L.), *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 4, 321–327.

Bourgin, J. P., Nitsch, J. P., 1967, Obtention de Nicotiana haploides a partir d'etamines cultivees in vitro, *Ann. Pysiol. Veget*., 9: 377-382.

Bregitzer, P., 1992, Plant regeneration and callus type in barley: effects of genotype and culture medium, *Crop Sci*., 32: 1108-1112.

Bregitzer, P., Dahleen, L.S., Campbell, R.D., 1998, Enhancement of plant regeneration from callus of commercial barley cultivars, *Plant Cell Rep*., 17(12):941–945.

Cai, Q., Szarejko, I., Polok, K., Maluszynskı, M., 1992, The Effect of Sugars and Growth Regulators on Embryoid Formation and Plant Regeneration from Barley Anther Culture, *Plant Breeding*, 109: 218-226

Castillo, A. M., Egaña, B., Sanz, J. M., Cistué, L., 1998, Somatic Embryogenesis And Plant Regeneration From Barley Cultivars Grown İn Spain, *Plant Cell Reports*, 902-906.

Chu, C.C., 1978, The N6 Medium and Its Applications to Anther Culture of Cereal Crops, *Proc. Symp. Plant Tissue Culture*, 45–50.

Cistué, L., Ramos, A., Castillo, A.M., ve Romagosa I., 1994, Production of large number of double haploid plants from barley anther pretreated with high concentrations of mannitol, *Plant cell reports*, 13, 709-712

Cistué, L., Ramos, A., Castillo, A.M., 1999, Influence of anther pretreatment and culture medium composition on the production of barley double haploids from model and low responding cultivars, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 55: 159-166.

Çabuk, B., 2010, Mısırda (*Zea mays* L.*)* farklı 2,4-D dozlarının kallus oluşumu ve kromozomal yapıya etkisi, Doktora tezi, *Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü,* Ankara,1-153.

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.

Daniel, G., 1993, Anther Culture in Rye: Improved Plant Regeneration Using Modified MS-Media, *Plant Breeding*, 110, 259-261

Dağüstü, N., 2002., Factors Affecting the Anther Culture of Wheat (*Triticum aestivum* L.). Biotechnology&Biotechnological Equipment

Dahleen, L.S., 1995, Improved plant regeneration from barley callus cultures by increased copper levels, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 43: 267-269.

Dahleen L.S., 1999, Donor-plant environment effects on regeneration from barley embryo derived callus, *Crop Sci.*, 39: 682-685.

Dahleen, L.S., Bregitzer, P., 2002, An improved media system for high regeneration rates from barley immature embryo-derived callus cultures of commercial cultivars, *Crop Sci*., 42: 934-938.

Dayan, S., 2011, Ayçiçeğinde (*Helianthus annuus* L.) anter kültürü yolu ile haploid bitki eldesi üzerine araştımalar, Doktora tezi, *Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,* Edirne, 1-152

Delporte, F., Mostade, O., Jacquemin, J. M., 2001, Plant regeneration through callus initiation from thin mature embryo fragments of wheat, *Plant cell, tissue and organ culture*, 67, 73-80

Doğramacı-Altuntepe, M., Peterson, T. S. And Juhar, P. P., 2001, Anther Culture-Derived Regenerants of Durum Wheat and Their Cytological Characterization, *J. Hered.*, 92: 56-64.

Dumas de Vaulx, R. and Chambonnet, D., 1982, Culture in vitro d'antheres l' aubergine (*Solanum melongena* L.): Stimulation de la production de plantes au moyen de traitments a $+35^0$C , *Agronomie*, 2 (10)- 983.

Dunwell, J. M., Francıs, 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.

Ellialtıoğlu, Ş., Sarı, N. ve Abak, K., 2001, Bitki Biyoteknolojisi-I Doku Kültürü ve Uygulamaları. Haploid Bitki Üretimi, M. Babaoğlu, E. Gürel, S. Özcan, *S.Ü.Vakfı Yayınları,* Konya,137-189.

Emiroğlu, Ü., 1982, Haploidi ve Bitki Islahındaki Önemi, *Ege Ü.Z.F. Yayınları*, Bornova- İzmir, 1-38

Engin, G., 1991, *Triticum aestivum* üzerinde Anter Kültürü Çalışmaları ,Yüksek Lisans Tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Eskişehir.

Er, C., 1992, Bitki Islahında Doku Kültürleri, *Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Yayını*, Ankara, 1-83.

Evrensel C., 2010, Arpa (*Hordeum Vulgare* L.) Doku Kültürlerinde Transpozon Analizi, Yüksek Lisans Tezi, *İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitsü*, İstanbul, 1-80

Ferrıe, A. M. R. and Keller, W. A., 1997, Plant Tissue Culture Manuel: Production of Haploids in *Brassica* spp. via Microspor Culture, *Kluwer Academic Publishers*, The Netherlands,1-17

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.

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

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

Foroughi-Wehr, B. and Mix, G., 1979, In-Vitro Response of *Hordeum vulgare*. Anthers Cultured ftom Plants Grown Under Ditferent Environments, *Enviromental and Experimental Botany*, 19: 303-309.

Ganeshan, S., Baga M., Harvey, B. L., Rossnagel, B. G., Scoles, G. J., Chibbar, R. N., 2003, Production Of Multiple Shoots From Thidiazuron-Treated Mature Embryos And Leaf-Base / Apical Meristems Of Barley (*Hordeum vulgare*), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 57-64.

Ganeshan, S., Chodaparambil, S.V., Baga, M., Fowler, D.B., Hucl, P., Rossnagel, B.G., Chibbar, R.N., 2006, In vitro regeneration of cereals based on multiple shoot induction from mature embryos in response to thidiazuron, *Plant Cell Tiss. Org. Cult*.,85: 63-73.

Gamborg, O. L., Miller, R.A., Ojima, K., 1968, Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells, *Exp. Cell Res.*, 60: 151-158.

George, E. 1996. Plant Propagation By Tissue Culture. Part 2: In Practice. 2. Edition. Exegetics Limited.

Germana, M. A., 2011a, Anther culture for haploid and doubled haploid production, *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 104:283–300

Germana, M. A., 2011b, Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding, *Plant Cell Rep*, 30:839–857

Gubisova, M., Mıhalık, D., Gubıs, J., 2012, Optimization Of Barley Mature Embyo Regerenation And Comparıson With Immature Embryos Of Local Cultıvars, *Nova Biotechnologica et Chimica*, DOI 10.2478/v10296-012-0006-z.

Guha S., Maheshwari S. C., 1964, In vitro production of embryos from anthers of Datura, *Nature*, 204:497–498

Gürel, A., Tosun, M., Demir, İ., 1992, Arpa Islahında Haploidi Teknikleri ve Anter Kültürünün Önemi, *2. Arpa-Malt Semineri*, Konya, 312-326

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.

Halámková, E., Vagera, J., Ohnoutková, L., 2004, Regeneration capacity of calli derived from immature embryos in spring barley cultivars. *Biol. Plant.* 48: 313-316.

Haliloğlu, K., Baenzinger, P. S., 2005, Screening wheat genotypes for high callus induction and regeneration capability from immature embryos cultures, *J. Plant Biochemistry and Biotechnology*, 14, 77–82.

Han, Y., Jın, X., Wu, F., Zhang G., 2011, Genotypic Differences İn Callus İnduction And Plant Regeneration From Mature Embryos Of Barley (*Hordeum vulgare* L.), *Journal of Zhejiang University-Scıence*, ISSN 1673-1581 (Print); ISSN 1862-1783.

Hanzel, J. J., Miller, J. P., Brinkman, M. A., Fendos, E., 1984, Genotype and media effects on callus formation and regeneration in barley, *Crop Science*, 25, 27-31.

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., 1999, Bitki Biyoteknolojisi, *Ç.Ü.Z.F. Genel Yayın*, Adana, 1-178

He, T., Jia, J.F., 2008, High frequency plant regeneration from mature embryo explants of highland barley (*Hordeum vulgare* L. var. nudum Hk. f.) under endosperm-supported culture. *Plant Cell Tiss Org Cult*., 95(2):251–254.

Ho, K. M., Jones, G. E., 1980, Mingo barley, *Can J Plant Sci*, 60:279–280

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. Plfanzenzüchtg, 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.

Jacquard C, Wojnarowiez G, Clement C., 2003, Anther culture in barley. In: Doubled haploid production in crop plants. A manual, Maluszynski M., Kasha K., Forster B. P., Szarejko I., *Kluwer Academic*, Dordrecht, 21–27

Jacquard, C., Asakaviciute, R., Hamalian, A.M., Sangwan, R.S., Devaux, P., Clément, C., 2006, Barley anther culture: effects of annual cycle and spike position on microspore embryogenesis and albinism, *Plant Cell Rep.*, 25:375-381.

Jensen, C. J., 1977, Monoploid production by chromosome elimination, *Tissue and Organ Culture*, 299-330.

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.

Kandeler, R., 1987, die Gewebekulturtechnik. Univ. Für Bodenkultur, *Institut für Botanik*, Wien-Österreich.

Kao, K. N., Saleem, M., Abrams, S., Pedras, M., Horn, D., Mallard, C., 1991, Culture conditions for induction of green plants from barley microspores by anther culture methods, *Plant Cell Reports*, 9:595 601

Karaca, Ö. ve Bürün, B., 1999, Bugdayda embriyo kültüründen kallus oluşumu. *Tr. J. Of agriculture and Foresty*, 23 (2), 269–274.

Karakullukçu, S., 1991, Değişik Patlıcan Genotiplerinde *in vitro* Androgenesis ve Haploid Bitki Oluşumunu Uyarıcı Bazı Etmenler Üzerine Araştırmalar, Doktora Tezi, *A.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 1-131

Kasha, K. J., 1974, Haploids in higher plants: advances and potential, *University of Guelph Press*, Guelph

Kasha K. J., Maluszynsky M., 2003, Doubled haploid production in crop plants. A manual. Production of doubled haploids in crop plants, Maluszynsky M, Kasha K. J, Forster B. P., Szaejko I., Kluwer/FAO-IAEA, Dordrecht/Vienna, pp 1–4

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.

Knudsen, S., Due, I.K., Andersen, S.B., 1989, Components of Response in Barley Anther Culture, Plant Breeding, 103, 241-246.

Kruczkowska, H., Paw£owska, H., Skucıñska, B., 2002, Influence of anther pretreatment on the efficiency of androgenesis in barley, *J. Appl. Genet.*, 43(3): 287-296

Kuhlmann, V., Foroughi-Wehr, B., 1989, Production of Doubled Haploid Lines in Frequencies Sufficient for Barley Breeding Programs. Plant Cell Rep. 8: 78-81.

Kuru, M., Ergene S., 2005, Genetik, *Palme Yayıncılık*, Ankara, 1-350

Larsen, E. T., Tuvesson, 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.

Lazaridou, T., B., Lithourgidis, A., S., Kotzamanidis, S., T., Roupakias, D. G., 2005, Anther Culture Response of Barley Genotypes to Cold Pretreatments and Culture Media, *Russian Journal of Plant Physiology*, 52 (5), 696–699.

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.

Li, W., Ding, C. H., Hu, Z., Lu, W., Guo G. Q., 2003, Relationship between tissue culture and agronomic traits of spring wheat, *Plant science*, 164, 1079-1085

Luckett, D. J., Smithard, R. A., 1995, A comparison of several published methods for barley anther, *Plant Cell Reports,* 14:763-767

Lührs, R., Lörz, H., 1987, Plant Regeneration İn Vitro From Embryogenic Cultures Of Spring And Winter Type Barley (*Hordeum Vulgare L.*) Varieties, *Theoretical And Applied Genetics,* 75, 16-25.

Maes, O. C., Chibbar, R. N., Caswell K., Leung, N., Kartha, K. K., 1996, Somatic embriyogenesis from isolated scutella of wheat: effects of physical, physiological and genetic factors, *Plant Science,* 25, 1113-1188.

Mendoza M. G., Kaeppler H. F., 2002, Auxin and sugar effects on callus induction and plant regeneration frequencies from mature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.), *In Vitro Cellular Developmental Biology,* 38, 39-45.

Murashige, T., Skoog F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant,* 15, 473-497.

Murovec, J., Bohanec, B., 2011, Haploids and Doubled Haploids in Plant Breeding

Olsen, F. L., 1987, Induction of microspore embryogenesis in cultured anthers of Hordrunt rdgurc.. The effect of ammonium nitrate. glutamine and asparagine as nitrogen sources, *Corlrherg RPS Commun.,* 52: 393-404

Omer, R. A., Ali A. M., Matheka, J. M., ve Machuka, J., 2008, Regeneration of Sudanese maize inbred lines and open pollinated varieties, *African Journal of Biotechnology*, 7 (11): 1759-1764.

Ouedraogo, J. T., St-Pierre, C., Collin, J., Rioux, S., Comeau, A., 1998, Effect of amino acids, growth regulators and genotype on androgenesis in Barley, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture,* 53: 59–66.

Ozias-Akins, P., Vasil, I. K., 1983, Improved efficiency and normalization of somatic embryogenesis in *Triticum aestivum* (wheat), *Protoplasma*, 117:40–44

Özcan, S., Babaoğlu, M. ve Sancak C., 2001, Somatik embriyogenesis. Bitki Biyoteknolojisi I, Özcan, S., Gürel, E., Babaoğlu, M., *S. Ü. Basımevi,* Konya, 71-88.

Özgen, M., Türet, M., Özcan, S., Sancak, C., 1996, Callus induction and plant regeneration from immature and mature embryos of winter durum wheat genotypes, *Plant Breeding*, 115: 455-458.

Özgen, M., Türet, M., Altınok, S., Sancak, C., 1998, Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes, *Plant Cell Rep,* 18: 331-335.

Özgen, M., Birsin, M.A., Önde, S., 2005, The effect of hybrid vigor on callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of barley (*Hordeum vulgare*), *Plant Cell Tiss Org Cult.,* 82(1):67–74.

Özü, M. E., 2006, Donör Bitkilerin Yetişme Koşulları Ve Farklı Kültür Sıcaklıklarının Ekmeklik Buğday (*Triticum aestivum L.)* Anter Kültüründe Haploid Bitki Rejenerasyonuna Etkileri Üzerine Bir Araştırma, Yüksek Lisans Tezi, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Adana, 1-68.

Pochard, E., Dumas de Vaulx, R., 1971, La monoploidie chez le piment (*Capsicum annuum*), *Z. für Pflanzenzüchtg*, 65: 23-46

Popelka, J.C., Altpeter F., 2001, Interactions between genotypes and culture media components for improved in vitro response of rye (Secale cereale L.) inbred lines, *Plant Cell Reports,* 20, 575–582.

Potrykus, I., Hams, C.T., ve Lörz, H., 1979, Callus formation from cell culture protoplast of corn (Zea mays L.), *Theor. Appl. Genet.*, 54:209-214

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.

Przetakiewicz, A., Orczyk, W., Nadolska-Orczyk, A., 2003, The effect of auxin on plant regeneration of wheat, barley and triticale. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 73, 245-256.

Ren, J., Wang, X., Yın, J., 2010, Dicamba and sugar effect induction and plant rejeneration from mature embryo culture of wheat, agricultural sciences in china, 9(1): 31-37

Rengel, Z., 1987, Embryogenic callus induction and plant rejeneration from cultured *Hordeum vulgare* mature embryos, *Plant Physiol Biochem*, 25:43-48

Roberts-oehlschlager, S. I. ve Dunwell, J.M., 1990, Barley anther culture: pretreatment on mannitol stimulates production of microspore-derived embryos, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.,* 20, 235-240.

Rotino, G., Falavigna, A., Fiume, F., Nervo, G., Restaino, F., 1987**,** Possibility of Eggplant (*Solanum melongena* L.) Improvement Through *in vitro* Techniques, *Genetica Agraria,* Vol:XII, N:3, 314-315

Sahrawat, A. K., Chand, S., 2004, High frequency plant regeneration from coleoptile tissue of barley (*Hordeum vulgare* L.) Plant Sci, 167(1):27–34.

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.

Savaşkan, Ç., Szarejko, I., Toker, M. C., 1999, Callus Production and Plant Regeneration from Anther Culture of Some Turkish Barley Cultivars, *Turkish Journal of Botany*, 23, 359-365.

Schulze J., 2007, Improvements in cereal tissue culture by thidiazuron, *Fruit vegetable Cereal Sci Biotech,* 1:64-79

Serhantova, V., Ehrenbergerova, J., Ohnoutkova, L., 2004, Callus induction and regeneration efficiency of spring barley cultivars registered in the Czech republic. *Plant Soil Environ*, 50: 456-462

Shah, M., Jabeen, I. M., Ilahi, I., 2003, In vitro callus induction ,its proliferation and regeneration in seed explants of wheat (*Triticum aestivum), Pak. J. Bot.,* 35(2), 209-217

Shan, X. Y., Lı, D. S., Qu, R. D., 2000, Thidiazuron promotes in vitro regeneration of wheat and barley, *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 36: 207-/210.

Sharma, V. K., Hansch, R., Mendel, R. R., Schulze, J., 2005, Mature Embryo Axis-Based High Frequency Somatic Embryogenesis And Plant Regeneration From Multiple Cultivars Of Barley (Hordeum vulgare L.), *Journal of Experimental Botany*, doi:10.1093/jxb/eri186, 1913-1922.

Stamp, J.A., Meredith, C.P., 1988. Somatic Embryogenesis from Leaves and Anthers of Grapevine., Scientia Horticulturae, 35, 235-250.

Szarejko, I. ve Kasha, K. J., 1991, Induction of anther culture derived double haploids in barley, *Cereal Res. Commun.*, 19 (1-2): 212-237

Taniguchi, M., Enomoto, S., Komatsuda, T., Nakajima, K., Ohyama, K., 1991, Varietal differences in the ability of callus formation and plant regeneration from mature embryo in barley (*Hordeum vulgare* L.), *Jpn. J. Breed*, 41(4):571-579

Thomas, M. R., Scott, K. J., 1985, Plant regeneration by somatic embryogenesis from callus initiated from immature embryos and immature inflorescences of Hordeum vulgare, *Journal of Plant Physiology*, 121, 159–169.

Tidema, A., Truve, E., 2004, Efficient regeneration of fertile barley plants from callus cultures of several Nordic cultivars. *Hereditas*, 140: 171-176.

Tiidema A.; Truve E. Efficient regeneration of fertile barley plants from callus cultures of several Nordic cultivars, *Hereditas*, 140: 171–176; 2004.

Touraev, A., Vicente, O., Heberle-Bors, E., 1997, Initiation Of Microspor Embryogenesis By Stres, *Trends In Plant Science*, Vol:2 (8): 297-302.

Tuberosa, R., Sanguinetti, M. C., Conti, S., 1987, Anther Culture Of Eggplant (*Solanum melongena* L.) Lines And Hybrids, *Genetica Agraria*, 41: 267- 274.

Turhan, H., Baser, I., 2004, Callus Induction from Mature Embryo of Winter Wheat (*Triticum aestivum* L.), *Asian Journal of Plant Sciences*, 3 (1), 17-19.

Um M. O.; Park T.; Kim Y. J.; Seo H. Y.; Kim J. G.; Kwon S. Y.; Kwak S. S.; Yun D. J.; Yun S. J., 2007, Particle bombardment-mediated transformation of barley with an Arabidopsis NDPK2cDNA. *Plant Biotech Rep* 1: 71–77

Wenzel, G., And Foroughı-Wehr, B., 1994, Plant Cell and Tissue Culture: Production and Use of Isogenic Lines, I.K. Vasıl Ve T.A.Thorpe, *Kluwer Academic Publishers*, Dordrecht- Hollanda, 153-172.

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.

Varshney, A., Jain, S., Kothari, S. L., 1999, Plant regeneration from mature embryos of 20 cultivars of wheat, *Cereal Research Communications*, 27 (1-2), 163-170.

Vasil, I.K., 1980., Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture Supplement: Androgenetic Haploids, *11A Int. Review of Cytology, Academic Press*, New York. pp.195-213.

Vidalie, H., 1984. La Culture In Vitro et Ses Applications Horticoles. Tech. Docum. Lavoisier, Paris, 151p.

Vitanova, Z., Vitanov, V., Trifonova, A., Savova, D., Atanassov, A., 1995, Effect of 2,4-D precultivation on regeneration capacity of cultivated barley, *Plant Cell Rep*., 14: 437–441

Yıldırım, M. B., Yıldırım, Z., Çaylak, Ö., 1990, Patateste Anter Kültürü Yoluyla Haploid Elde Edilmesi, *Doğa Tr. J. of Agriculture and Forestry Tübita*k, 14, 543-554.

Zapata, J.M., Sabater, B., Martin, M., 2004, Callus induction and in vitro regeneration from barley mature embryos. *Biol Plant.*, 48(3):473–476.

Zhou, H., Konzak, C.F., 1989. Improvement of Anther Culture Methods for Haploid Production in Wheat . Crop Sci. 29: 817-821.

Zhou, H., 1996, In Vitro Haploid Production in Higher Plants. Vol. 2: Green Plant Regeneration from Anther Culture in Cereals Jain, S.M., Sopory, R.E., Veilleux, , *Kluwer Academic*, Dordrecht, 169-187.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	**:**	Münüre TANUR ERKOYUNCU
Uyruğu	**:**	T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi	**:**	Konya/09.04.1987
Telefon	**:**	0332 223 27 75
Faks	**:**	
e-mail	**:**	mtanur@selcuk.edu.tr

EĞİTİM

Derece		**Adı, İlçe, İl**	**Bitirme Yılı**
Lise	:	Atatürk Kız Lisesi Selçuklu Konya	2004
Üniversite	:	Selçuk Üniversitesi	2009
Yüksek Lisans	:	S. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü	2010-
Doktora	:		

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	**Kurum**	**Görevi**
2011-Halen	S. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalı	Araştırma Görevlisi

UZMANLIK ALANI: Bitki Biyoteknolojisi, Bitki Doku kültürü Çalışmaları

YABANCI DİLLER: İnglizce

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER: 2009-2010, Erasmus Öğrenci Değişim programı ile İtalya Basicilita Tarım Üniversitesi'nde lisans eğitimi