

24265

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Kod: 10.0600.0000.014

HORDEUM VULGARE L. (ARPA) ÜZERİNE
ANTER KÜLTÜRÜNÜN UYGULANABİLİRLİĞİ
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

HAZIRLAYAN : Bengi BABA

DANIŞMAN : Prof.Dr. Günnehir OĞUZ

Bu tez

Prof.Dr.Günnehir OĞUZ

Prof.Dr.Teoman KESERCİOĞLU

Doç.Dr.Kamil YÜREKLİ

tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

Bornova - İZMİR

1992

YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

ÖNSÖZ

Doku kültür yöntemlerinden biri olan anter kültürü yöntemi ile haploid bitkilerin eldesi ve böylece bitki ıslahında yeni bir ufkun açılışı; tahıl gurubu bitkilerden arpa'nın beslenmedeki önemi ile birleşince, arpa'da anter kültürünün uygulanabilirliği ayrı bir önem kazanmaktadır. Halen bu konuda tüm Dünya'da yapılan çalışmalar hızla sürmekte iken, ülkemizde bu çalışmalara öncülük etmek, yerli çeşitleri de denemek ve anabilim dalımızda benzeri çalışmalara zemin oluşturmak amacı ile planlanan bu çalışma sırasında, anabilim dalımızdaki olanakları bize sunan Bölüm Başkanımız Prof.Dr. Bilkan ÖZÖRGÜCÜ'ye, ve kendi çalışma guruplarının imkanları ile bizi destekleyen, Üniversitemiz Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Öğretim elemanlarından, Doç.Dr.Muzaffer TOSUN'a, Dr.Aynur GÜREL'e, bilgilerini paylaştığım Araş.Gör.Hatice DEMİRAY'a ve çalışmamı yöneten Sayın Hocam Prof.Dr.Günnehir OĞUZ'a teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ABSTRAKT

ABSTRACT

1.GİRİŞ	1
2.MATERYAL ve METOD.....	7
2.1.Materyal.....	7
2.2.Yöntem.....	8
3.BULGULAR.....	17
3.1.Uygun Evredeki Başak Seçimi.....	17
3.2.Kallus Verimi İle İlgili Sonuçlar...	18
3.3.Submakroskopik yapıların, mikroskopik görünümü.....	23
4.TARTIŞMA.....	26
5.ÖNERİLER.....	30
6.ÖZET.....	31
7.SUMMARY.....	32
8.LİTERATÜR.....	33

ABSTRAKT

Hordeum vulgare L. (Arpa) Üzerine Anter Kültürünün Uygulanabilirliği

Arpa yerli çeşitlerinden 2 sıralı TOKAK, KAYA, YERÇİL; 6 sıralı YEŞİLKÖY ve GEM'in modifiye N_6 ortamında 15 ve 30 gün $+4^{\circ}C$ soğuk önuygulama sonucunda mikrospordan kallus ve embriyoid eldesi araştırılmıştır.

Bunlardan 15 günlük önuygulama yapılmış TOKAK, YERÇİL ve GEM çeşitlerinden kallus; GEM çeşidinden ise embriyoid elde edilmiştir.

ABSTRACT

Application to Anther Culture of Barley (*Hordeum vulgare* L.)

Native barley varieties of two-rowed TOKAK, KAYA and YERÇİL and six-rowed YEŞİLKÖY, GEM were treated modified N_6 induction medium with pretreatment for 15 days and 30 days at $+4^{\circ}C$ temperature. And so obtaining calli and embrioid from microspore were investigated.

It was obtained calli from TOKAK, YERÇİL and GEM which were treated 15 days cold pretreatment, and only GEM varieties induced for embrioid.

1. GİRİŞ

Bitkisel ürünlere duyulan ihtiyacın giderek artması sonucunda, araştırmacılar, son yıllarda bitkilerin çeşitli ortam koşullarında yetişmesini sağlamak ve üründe artış, erkencillik, dayanıklılık gibi özellikleri bitkiye kazandırmak için çeşitli genetiksel ve fizyolojik çalışmalara yönelmişlerdir. Daha sonraları, biyokimyasal ve moleküler biyolojik bilgilerin artması sonucunda, bu bilim dalları da konu ile ilgilenmeye başlamışlardır. Tüm bu bilim dallarının ortak olarak çalışabildiği yöntemlerden biri de DOKU KÜLTÜRÜ TEKNİKLERİ olarak adlandırılmaktadır.

Nitekim, bitki doku kültürü çalışmaları, bitkilerin moleküler yapıları, fizyolojileri, biyokimyaları ve genetik yapıları ile ilgili pek çok konuyu aydınlatmaya çalışırken bir yandan da bol ve kaliteli ürün elde etmeyi hedeflemiştir(ENGİN,1991).

Doku kültürü teknikleri sayesinde, hücre protoplast, embriyo ovaryum ve anter'den veya meristem dokusundan invitro koşullarda tam bir bitki elde etmek mümkün hale gelmiştir.

Bitki doku kültürleri, diğer üretim yöntemlerinden farklı olarak bitkilerin çeşitli kısımlarından alınan eksplantların, sterilize edildikten sonra, çeşitli maddeler içeren steril gıda ortamında ışık ve sıcaklık gibi uygun çevre koşullarında kültüre alınması işlemidir. Bu yöntem; embriyo, çiçek gibi oluşturulacak yapının adı ile anılabildiği gibi, yapının kökeni olan, hücre veya anter gibi doku ya da kısımlarının isimleri ile de anılmaktadır.

İlk doku kültürü düşüncesi 1902 yılında Alman Botanikçi HABBERLANDT tarafından ortaya atılmıştır. Gerek Habberlandt'ın gerekse daha sonra KNUDSON (1919), THIELMAN (1925),CZECH (1926), KUNKEL (1927), KEMMER (1928), PFEIFFER (1931) gibi araştırmacıların yaptıkları çalışmalar yeterince başarılı olamamıştır.

1922 yılında ROBBINS ve KOTTE tarafından fide köklerinin uçlarından alınan parçalar, inorganik tuz ve glukoz içeren sıvı bir besi ortamında kültüre alınmıştır (GÖNÜLŞEN,1987).

GAUTHERET (1939) bir sıra canlı hücrelerin ya da çok küçük boydaki doku parçalarının bölünerek hacimlerini arttırdıklarını gözlemiş; bazı havuç doku kolonilerine ait hücrelerin İndol Asetik asit (IAA) etkisi ile ayrıştıklarını ve bir kısmının bölünme yeteneğinde olduğunu kaydetmiştir.

1954 yılında MUIR ve arkadaşları, 1955'te ise STEWART ve SHANTZ hareketli sıvı ortamlara yerleştirilen invitro doku kültürlerinin, kendiliğinden tek tek ya da hücre kolonilerine ayrıştıklarını göstermişlerdir.

TORREY (1957) ise kültür parçası içeren sıvı bir besi ortamına yerleştirdiği bir bezelye hücresinin bölünmesini mikroskopta gözlemiştir.

JONES ve arkadaşları (1960) ana dokudan ayrılmış tütün hücrelerini incelemişler, BALL ve JOSHI (1965) özel bir sistem ile aynı çalışmayı daha ayrıntılı yapmışlardır. BERGMANN (1960) çalkalı bir sistem ile sıvı ortam içindeki kültürlerin süzülmesi ile toplanmış çok sayıdaki izole hücrelerin aynı petri kutusunda agarlı ortamda yetiştirilmesine olanak veren bir teknik geliştirmiştir. Bu teknik'ten pekçok bilim adamı yararlanmıştır.

Daha sonraları, SKOOG (1962) Nicotiana türleri üzerindeki çalışmalarında organ verme olaylarının kimyasal yolla kontrol altına alınması olanaklarını araştırmıştır. SKOOG ve MILLER (1962) organ veriminde etkili olan bitkisel hormonları ve bunların etkisini araştırmışlar ve MURASHIGE-SKOOG (1962) olarak bilinen besi ortamını geliştirmişlerdir.

Ancak, 1963 yılına kadar yapılan çalışmalar ve yenilikler hiçbir zaman sistemli bir şekle dönüşmemiştir. 1963 yılında LUTZ'un Murashige-Skoog (MS) gözeltisinde daha önceden izole edilmiş, hücrelerde % 70 bölünme görmesi sistemli hücre kültürü çalışmalarının başlangıcı sayılabilir. Zamanla bitki hücre kültürü ile ilgili çalışmalar arttıkça, konu belli organizasyonu da beraberinde getirmiştir. 1972'de 940 Bilim adamından oluşan, "Bitki Doku Kùltürleri Birliđi" 1980'lerde 2000'den fazla üyeye sahip

hale gelmiştir (KAYNAK VE YÜREKLİ, 1991).

Doku kültürünün ayrıcalığı; yalnız hızlı bitki üretimi değil, virüsten arınmış veya çeşitli metabolitlerin üretimi için geliştirilmiş bitki eldesi; ya da genetik karakterlerin korunmasında saklama tekniği ve üstün karakterli bireylerin eldesinde bir ıslah yöntemi de olmasıdır.

Doku kültürü çalışmalarının bitki ıslahına sağlayacağı katkılardan biri, haploid bitkilerin elde edilmesidir.

Haploid embriyo'ların oluşabilmesi için, haploid kromozom sayısını içeren, gamet hücrelerinin, döllenme olmaksızın gelişmesi ya da zigot oluşumunu izleyen hücre bölünmeleri sırasında ebeveynlerden birine ait kromozomların elemine olması gereklidir. Bazı durumlarda, dişi gametofit'in yumurta hücresi dışında başka bir hücresinden (örneğin Sinergit'lerden) de haploid embriyo gelişebilmektedir (EMİROĞLU, 1982).

Invitro koşullarda, anter'den haploid embriyoidlerin oluşması GUHA ve MAHESHWARI (1964) tarafından ortaya konmuştur. Bu araştırmacıların Datura innoxia anterlerini yapay besin ortamına alarak androgenetik haploidler elde etmelerinden sonra bunu Nicotiana tabacum, Oryza sativa, Brassica oleracea, Triticum aestivum, Lolium multiflorum üzerinde yapılmış anter kültür çalışmaları izlemiştir (BOURGIN ve NITSCH, 1967; NITSCH ve ark., 1969, 1970; KAMEYA ve HINADA, 1970). Hordeum vulgare L. üzerinde ilk anter kültürü çalışmaları 1971 yılında CLAPHAM tarafından yapılmıştır. Zamanla geliştirilen yöntemlerle olumlu sonuçlar alınmış ve elde edilen haploid bitkiler ıslah programlarında kullanılmaya başlanmıştır.

Haploid bitkiler, özellikle genetik araştırmalar ve bitki ıslahı yönünden büyük önem taşımaktadırlar. Geleneksel ıslah yöntemleri ile homozigot diploid bitkilerin elde edilmesi için uzun zaman isteyen bir seleksiyon ve homozigotlaştırma aşaması gerekmektedir. Bu zaman süreci, bitkilerin çiçek biyolojileri ve üzerinde çalışılan özelliklerin kalıtsal yapısına göre değişmektedir (5-

10 yıl). Halbuki haploid bitkilerin kromozomlarının iki katına çıkarılması, bir generasyonluk süreyi gerektirmektedir. Bu da anter kültür tekniğinin zaman tasarrufu açısından ayrıcalığıdır (DE BUYSER ve ark., 1985).

Diğer taraftan, kendine döllek bitkilerde, veya yabancı döllek bitkilerde, zaman alıcı da olsa kendilemeler ile homozigotluk sağlanabilmektedir. Fakat, kendine uyuşmazlarda bunu elde etmek mümkün değildir. Anter kültür tekniği yolu ile bu sorun da ortadan kaldırılmaktadır.

Homozigot diploid bitkilerden, resesif karakterli genotiplerin seçimi çok önemlidir. Geleneksel ıslah yöntemleri ile bunların elde edilmesi oldukça zordur. Her generasyonda, tek bitki seleksiyonu yapılsa bile heterozigot yapı ve dolayısı ile açılma nedeni ile istenen karektere sahip bitkiler, istatistikî hatalar veya yeni kombinasyonların gözden kaçması ile daha sonraki generasyonlarda kaybolabilmektedir. Anter kültür tekniği ile bu sorun da aşılabilmektedir. Bu teknik ile, arpa mozaik virüsüne dayanıklılığı sağlayan resesif homozigot genleri içeren genotipe sahip bitkiler üretilmiştir (FOROUGHİ-WEHR ve FRIEDT, 1984).

Anter kültürü tekniğinin diğer bir yararı da; besi ortamına inoküle edilen gametik hücrelerden, rekombinantların veya mutant tiplerin seçilebilmeleri, geliştirilebilmeleri ve bitki ıslahında kullanılabilmeleridir (YE ve ark, 1987; PALSONİ ve ark., 1988). Anter kültürü tekniğinin kullanım alanı özellikle beslenme de önemli bir yeri olan tahıl gurubu bitkilerinin, ıslah programlarında büyük bir potansiyele sahiptir. Fakat, anter donör bitkilerinin yetiştirilme koşulları, hasat edilen başaklara inokülasyon öncesi uygulanan vernalizasyon işlemi (önuygulama), polen gelişim evreleri, anter donör bitkilerinin genotipi, besi ortamının bileşimi ve fiziksel yapısı, invitro koşulları, albinizm gibi faktörler haploidlerin elde edilmesindeki başarıyı sınırlandırmaktadır.

Anter kültürü tekniğinin tahıl gurubu bitkilerinin ıslah proğ-

ramlarında olumlu sonuçlar vermesine karşın, uygulamada karşılaşılan bu sorunlar, bilim adamlarını bu konulara çözüm getirecek çalışmalar yapmaya yöneltmiştir.

Tahıl gurubu bitkilerinden, Triticum aestivum (Buğday) üzerinde ilk anter kültürü çalışmalarına 1970'li yıllarda rastlanmaktadır (CHU ve ark.,1973; QUYANG ve ark.,1973; PICCARD ve DE BUYSER, 1973). CLAPHAM(1971)'in arpa anter kültürü ile ilgili ilk raporundan beri, genotipin etkisi, donör bitkilerinin ön uygulama koşulları, hormonların etkisi, çeşitli sıcaklıklarda anter uygulamaları gibi çok sayıda konu çalışılmış ve açıklayıcı olarak rapor edilmiştir(CLAPHAM,1973; GRUNEWALDT ve MALEZPY,1975; FOROUGH-UGHI-WEHR ve FRIEDT,1981; HUANG ve SUNDERLAND,1982).

Çin'de Sinica Akademisi Genetik Enstitüsünde; Igrı, Doublet, Harrington, Harrington GM No.2, Triumph, Goft, Sabarlis, Wen I, B 624, B 628, B 631, B 633, B 661, B 683 varyetelerini içeren 15 arpa genotipi anter kültüründe denenmiş ve genotipin anter kültürü açısından etkisi incelenmiştir (HAN, 1991).

Arpa anter kültüründe androgenesis'i kontrol eden en önemli faktörlerden birisi de donör bitkilerin fizyolojik koşullarıdır (VASIL ,1980). Işık şiddeti, sıcaklık, besin ve CO₂ değişimi gibi kritik çevre faktörleri, anter donör bitkisinin içsel durumuna etki edebilir. Bu faktörler birbirlerini etkiledikleri gibi, ayrıca kompleks bir şekilde donör bitki üzerinde de etkilere sahiptirler (WENZEL ve FOROUGH-UGHI-WEHR, 1984).

Arpa anter kültürü tekniğinde, başağa veya anterlere uygulanan belirli muameleler, mikrospor gelişimi üzerine pozitif bir etkiye sahiptir. Anter kültüründe kullanılan en etkili ön uygulama tekniği soğuk muamelesidir (HUANG ve SUNDERLAND,1981).

Arpa anter kültüründe, kallus indüksiyon ortamı olarak, Patates Ekstrakt Ortamı II (CHUANG ve ark.,1978), bazı modifikasyonlarla MS (MURASHIGE ve SKOOG,1962) ve N₆ (CHU, 1978) ortamlarının çoğunlukla kullanıldığını belirtmek mümkündür. Son zamanlarda geliştirilen EDAM I ortamı da başarılı sonuçlar vermektedir

(SORVARI ve SCHIEDER, 1987).

Arpa anter kültüründe embriyonik gelişme üzerine HUNTER(1985) ve DATTA (1987) hariç çok az rapor vardır. HUNTER (1985); mikrospor türevli embriyoidlerin indüksiyonu için anter yerleşiminin önemi belirtmiştir. DATTA (1987) ise polen embriyogenesisini ve sonra oluşan arpa başak kültüründe bitki rejenerasyonunu rapor etmiştir.

Öte yandan, arpa için belirtilen 3 gen merkezinden biri Anadolu'dur; ve bu merkez kültür çeşitleri açısından diğerlerine baskındır (KÜN, 1988).

Bütün bu bilinenler, ülkemizde de arpa anter kültür çalışmaları yapılması gerçeğini ortaya çıkarmaktadır. Böyle olmasına karşın, arpa'da anter kültür tekniği ile ıslah çalışmaları araştırmacılarımız için yenidir ve bu konuda yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Son günlerde, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri bölümü öğretim görevlilerinden TOSUN ve GÜREL tarafından yürütülen TÜBİTAK destekli bir proje ile anter kültürü tekniğinin kullanılması ile haploid bitki eldesi çalışmaları uygulamaya konulmaktadır.

Bu bilinenler doğrultusunda, Anadolu'nun gen merkezi olduğu iki ve altı sıralı arpa çeşitlerinin ıslahında anter kültürü tekniğinin uygulanması bu çalışmada amaç olarak seçilmiştir.

2. MATERİYAL ve METOD

2.1. MATERİYAL

Araştırmamızda arpa yerli çeşitleri olan TOKAK 157/37, KAYA 7794 YERÇİL 147, YEŞİLKÖY 387, GEM 8889 materyal olarak kullanılmıştır.

Yurdumuzdaki ıslah çeşitlerinin çoğu, Hordeum vulgare convar. distichon Alef. v. nutans Schubl'a girmektedir. Bunlar iki sıralı, seyrek başaklı, beyaz daneli, dişli, kılçıklı arpalardır. Bu çeşitler çoğunlukla, yurdun iç bölgelerinde yetiştirilmektedir. Deney materyallerimizden TOKAK 157/37 Ankara Tohum Islah İstasyonunca 1937 yılında seleksiyon ile elde edilmiş ve 1963'de tescil edilmiştir. Alternatif özellikte ve kışa dayanıklıdır. İki sıralı, beyaz seyrek başaklı, kaba kılçıklı, kavuzlu beyaz danelidir. Kışa, kurağa, başak kırılmasına, راستیға, sarı ve kahve rengi pasa dayanıklı, kara pasa zayıftır.

KAYA 7794 ise Ege Bölgesi Zirai Araştırma Enstitüsünce seleksiyonla elde edilmiş 1977'de tescil edilmiştir. Nutans botanik varyetesinin iki sıralı, beyaz seyrek başaklı, dişli kılçıklı, beyaz daneli olma özelliklerini taşır. Hastalıklara özellikle küllemeye ve yatmaya dayanıklı, kışa zayıf bir çeşittir. Kıyı bölgelerimizde güzlük olarak ekilebilir.

YERÇİL 147 Eskişehir Zirai Araştırma Enstitüsünce 1956'da introduksiyonla elde edilmiş, 1975'de tescil edilmiştir. Alternatif olup, kıyı bölgelerinin kışlarına dayanabilir. İki sıralı, beyaz başaklı, dişli kılçıklı beyaz danelidir. Kurağa, yatmaya, başak kırılmasına, hastalıklara genellikle dayanıklıdır. Suyu ve gübreye tepkisi yüksek, verimli bir çeşittir. Geçit bölgelerinin sulanır alanlarına erken yazlık ekimi önerilebilir.

Altı sıralı arpa çeşitleri, Hordeum vulgare convar. hexastichon Alef. v. pallidum Al. botanik varyetesi içine girer.

Bunlardan YEŞİLKÖY 387, Yeşilköy Zirai Araştırma Enstitüsünce

1962 yılında tescil ettirilmiş bu melez (ZAFER 160x335) arpa; altı sıralı, beyaz seyrek başaklı, dişli kılçıklı, beyaz daneli, alternatif bir çeşittir. Kışa, kurağa, yatmaya, hastalıklara ve başak kırılmasına dayanıklıdır.

GEM 8889 ise Ege Bölge Ziraî Araştırma Enstitüsünce 1970'de introdüksiyon ile elde edilmiş 1974'te tescil edilmiştir. Altı sıralı, beyaz seyrek başaklı, yarı düz kılçıklı, yazlık; kurağa, yatmaya, dane dökmeye, hastalıklara dayanıklı, kışa zayıf, erkenci bir çeşit olup daha çok yemlik arpa özellikleri gösterir (KÜN, 1988).

2.2. METOD

2.2.1. ANTER VERİCİ BİTKİLERİN ELDESİ METODLARI

Anter kültürü tekniğinin uygulanabilmesi için gereken anter verici bitkilerin eldesi tüm çeşitlerin Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümünden ve Menemen Bölge Ziraî Araştırma Enstitüsünden sağlanan tohumları ile gerçekleştirilmiştir.

Arpanın beş farklı yerli çeşitine ait Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümünden sağlanan tohumlar, aynı Bölümün Bornova deneme tarlasında yetiştirilmiştir.

Menemen Bölge Ziraî Araştırma Enstitüsünden sağlanan tohumlar ise içinde 1:1:1 oranında toprak:çiftlik gübresi:kum karışımı bulunan saksılarda, Biyoloji Bölümüne ait seralarda, sera koşullarında yetiştirilmiştir (Resim 1).

Saksılara ekim, 21.10.1991 tarihinde gerçekleştirilmiş ve başaklar Mayıs.1992 içinde hasat edilmiştir.

Seralarda Ocak ve Şubat.1992 aylarında ısıtmanın sağlanamaması nedeni ile, saksıdaki bitkicikler, saksıları ile birlikte 27°C sıcaklıkta 16 saat ışıklandırılmalı kapalı odalara aktarılmış

(Resim 2), rutubetin fazla gelmesi sonucu bitkilerde karapas hastalığı oluşmuştur. Bu nedenle ilaçlanan bitkilerin başakları daha sonra hasat edilmelerine karşın, ilacın ve hastalığın etkileri düşünülerek kullanılmamıştır.



Resim 1. Sera'larda yetiştirilen bitkilerin genel görünüşü.

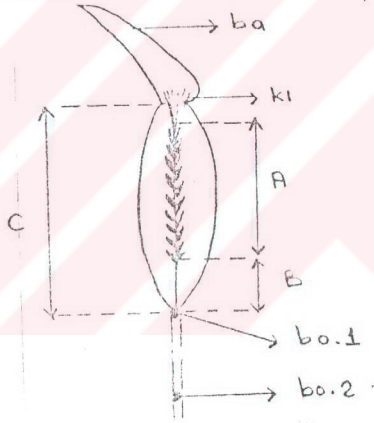


Resim 2. Kapalı odada yetiştirilen bitkilerin genel görünüşü.

2.2.2. BAŞAKLARDA HASAT ZAMANININ TESBİTİ METODU

Tarla ve Seradaki bitkiler hergün kontrol edilerek uygun evredeki başaklar için kriter geliştirilmeye çalışılmıştır. Orta ve geç tek çekirdekli evreye sahip mikrosporların çoğunlukta bulunduğu anterlere sahip başakların morfolojik konumu baz olarak kullanılmıştır (WENZEL ve FOROUGHİ-WEHR, 1984).

Bu kritere her hangi bir literatürde rastlanılmadığından; kriter ön çalışma sonucunda tarafımızca belirlenmiştir. Yine de hasat için kabul edilen kriter, inokülasyon öncesinde yeterli kabul edilmeyip, sitolojik inceleme yapılmıştır (Şekil 1).



Şekil 1. Uygun evredeki bir başağın şekli. (A=Başağın verimli kısmı, B=Pedisel, C=Kın uzunluğu, bo.1.=Birinci boğum, bo.2=İkinci boğum, k1=Arista(kılçıklar), ba=Bayrak yaprak.).

Hasat edilen başaklar başak sapının üstten ikinci boğumuna kadar su içinde olacak şekilde su dolu kavanozlara yerleştirilmişlerdir.

2.2.3. ÖN UYGULAMA METODLARI

Hasat edilen ve kavanozlara yerleştirilen başaklar, hasat sonrasında iki guruba ayrılmışlar ve soğuk uygulaması için, $+4^{\circ}\text{C}$ 'ta buzdolabında karanlıkta bırakılmışlardır.

Soğuk uygulamanın, birinci gurubu 15 gün, ikinci gurubu ise 30 gün $+4^{\circ}\text{C}$ 'ta bırakılmışlardır. Soğuk ön uygulama nedenleri, VA-SIL (1980) tarafından şöyle belirtilmektedir.

1. Soğuk uygulaması, zayıf ve güçlü olmayan anter ve mikrosporları öldürmektedir.
2. Nişasta üretimi bloke edilmektedir.
3. Anter duvarının yaşlanması geciktirilmektedir.
4. Mitoz'a maruz kalmış mikrospor sayısını arttırmaktadır.

Soğuk uygulaması sonucunda, sitolojik gözlemlerin de yardımı ile uygun evrede olan başaklar seçilmiş, diğerleri atılmıştır.

2.2.4. STERİLİZASYON VE BESİ ORTAM HAZIRLAMA METODLARI

Anter kültürü için kullanılan 4, 6, 9 cm çaplı cam petriler, 150°C 'ta etüvde 2 saat süreyle kuru sterilizasyona tabi tutulmuştur. İnokülasyon sırasında kullanılan diğer malzemeler ve besi ortamı ise otoklavda 121°C sıcaklıkta ve 1 atmosfer basınçta 1/2 saat süreyle buhar sterilizasyonuna bırakılmıştır. 9 cm steril plastik petriler kullanıldığında, doğrudan doğruya steril kabinde açıldığından sterilizasyon uygulanmamıştır.

Arpa anter kültürü için CHU (1978) tarafından geliştirilen N_6 mineral tuz ortamına 8 mg/l Glutamin, 100 mg/l myo İnositol, 0,5 mg/l Nikotinik asit, 0,5 mg/l Piridoksin HCl, 1 mg/l Tiamin, 0,5 mg/l Kinetin, 1,5 mg/l Naftalen asetik asit (NAA), 7 g/l agar, 50 g/l sakkaroz ilavesi ile geliştirilmiş ve indüksiyon ortamı

olarak kullanılmıştır (Çizelge 1).

Çizelge 1. İndüksiyon besi ortamı içeriği.

<u>Makro elementler</u>	<u>Miktar mg/l</u>
KNO ₃	2830
(NH ₄) ₂ SO ₄	463
KH ₂ PO ₄	400
MgSO ₄ .7H ₂ O	185
CaCl ₂	166,6
NaEDTA.2H ₂ O	37,3
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,85
<u>Mikro elementler</u>	
MnSO ₄	3,33
H ₃ BO ₃	1,6
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,5
KI	0,8
<u>Vitaminler</u>	
Thiamin	1
Pyridoksin HCl	0,5
Nikotinik asit	0,5
<u>Organik maddeler</u>	
Myo-İnositol	100
Glutamin	8
Agar	7000
Sakkaroz	50000
<u>Hormonlar</u>	
NAA	1,5
Kinetin	0,5

pH = 5,8

Bu ortam Edam I ve Patates Estrakt II ortamlarından farklı olarak Glisin yerine bazik aminoasitlerden Glutamin içermesi ile farklıdır. Böylece kültür sırasında diğer aminoasitlerin sentezi

için öncül bir aminoasit eklenmesi amaçlanmıştır. Hazırlanan ortamların pH'ları 0,1 N NaOH ve 0,1 N HCl yardımı ile 5,8'e ayarlanmış ve sterilize edildikten sonra, steril kabinde steril veya steril edilmiş petrilere boşaltılmıştır. İçlerine ortamlar aktarılan petriler, 1 hafta bekletilerek baştan gelebilecek bulaşma sonucu enfekte olanlar kullanılmamıştır. Bunda da inokülasyon sonrasında anter kaybının önlenmesi amaçlanmaktadır.

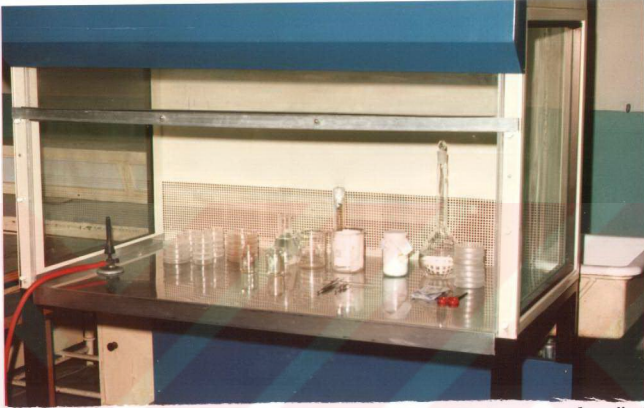
2.2.5. ANTERLERİN İNOKÜLASYON METODU

+4°C'ta buzdolabında karanlıkta bırakılan başaklar, soğuk uygulama sonrasında bayrak yapraklarından ayrılarak, arista (kılçık)larından arındırılmış, alt ve üst spikula (başakçık)ların anterleri lam üzerine alınmıştır. Daha sonra üzerlerine bir damla asetoorsein boyası ilave edilerek ezme preparat hazırlanmıştır. Mikroskop altındaki incelemeler sonucu maksimum sayıda uygun evredeki mikrosporları (Resim 3) içeren anterlere sahip sağlıklı başaklar korunarak diğerleri atılmıştır.

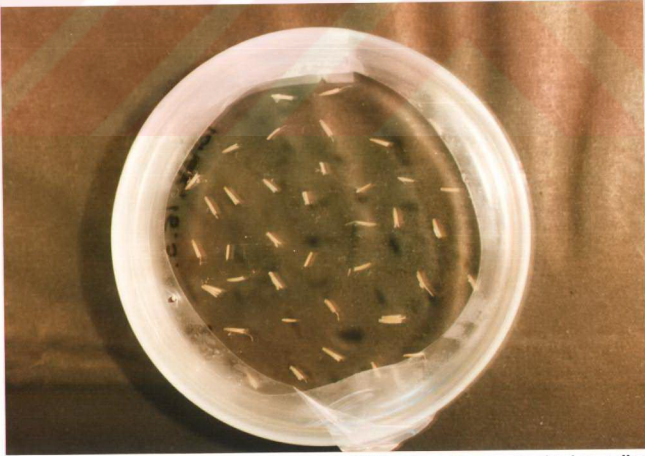


Resim 3. Geç tek çekirdekli evredeki mikrosporum görünüşü. x40x6,3

Uygun evredeki başaklar laminar akımlı steril kabinde (Resim 4) önce % 2,5'luk Sodyum hipoklorit'te (çamaşır suyu) 2 dakika bekletilip, yüzeysel olarak sterilize edilmiş daha sonra iki kez bidistile su içinden geçirilmiştir.



Resim 4. Laminar akımlı steril çalışma kabininin genel görünüşü.



Resim 5. İnokülasyon sonrasında parafilm kaplı petrinin görünüşü.

Sterilize edilen anterler, içlerinde N_6 indüksiyon ortamı bulunan petri kaplarına inoküle edilmiş, inokülasyon sonrası, dışarıdan gelebilecek her hangi bir enfeksiyonu önlemek amacı ile petri kaplarının etrafı parafilmle kapatılmıştır(Resim 5).

2.2.6. KÜLTÜR KOŞULLARINDA KULLANILAN METOD

Arpa başaklarından, anterlerin inoküle edilip kültüre edildiği petri kapları, kültür sonrası karanlıkta, $25 \pm 1^{\circ}C$ ta mikrobiyotonda bırakılmıştır(resim 6,7).



Resim 6. Mikrobiyotron'un dıştan görünüşü.

Petriler inokülasyonun 15 gün sonrasında iki günde bir mikroskop altında incelenerek, kallus ve embriyoid oluşup oluşmadığı incelenmiştir.

Embriyoid ve kallus oluşumu görülen petrilerdeki oluşumların fotoğrafları mikrofotografi cihazında çekilmiştir.



Resim 7. Mikrobiotron'un iç kısmının görünüşü.

3. BULGULAR

3.1. UYGUN EVREDEKİ BAŞAK SEÇİMİ İLE İLGİLİ BULGULAR

WENZEL ve FORDUGH-WEHR (1984)'e göre arpa anter kültürü için başaklar mikrospor gelişmesinin birinci mikrospor mitozuna yakın tek çekirdekli döneminde alınmalıdır. İstenen mikrosporları elde etmek ve mikroorganizmalarla olan bulaşmalardan kaçınmak için, başaklar henüz bayrak yapraklarının içindeyken seçilmelidirler.

Konuya ait literatürde, uygun evrenin belirlenmesi için bayrak yaprağının başakla kaç derecelik açı yaptığı belirtilmediğinden açı belirlemesi için ön çalışma yapılmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre (Çizelge 2); bayrak yaprağı ile başak arasındaki açının 45 derece olduğu konumlarda (Resim 8) orta ve geç tek çekirdekli mikrospora maksimum oranda rastlanmıştır.

Çizelge 2. Bayrak yaprağı ile başak arasındaki açıya bağlı olarak mikrosporum bölünme evrelerinin toplam içindeki oranları.

Evreler/	Açı(derece)	0	45	90
Mayoz sonrası				
Tetrat		%70	-	-
Tek Çekirdekli				
Mikrospor		%30	%50	-
2 ve 3 Çekirdekli				
Mikrospor		-	%20	%10
Olgun Polen		-	%30	%90



Resim 9. İnokülasyondan 15 gün sonra petrilerdeki submakroskobik yapılara örnek.



Resim 10. 30 günlük önuygulama sonrasında inoküle edilen anterlerde filamentlerin görünüşü.



Resim 11. İnokülasyon sonrasındaki 15. günde uzamış filamentlerin görünüşü.

Anter'in filament uzamasında arpa çeşidinin 2 veya 6 sıralı olmasının önemli olmadığı Çizelge 3.'ten anlaşılmaktadır.

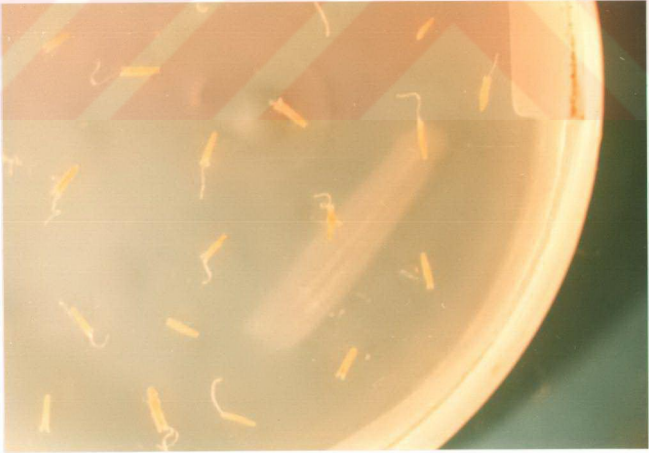
Çizelge 3. İnokülasyon sonrasında 15. günde çeşide bağlı olarak filament uzaması gösteren anter sayı ve oranı.

Çeşit	Sıra sayısı	Kültüre alınan Anter sayısı	Filament uzaması gösteren anter sa.	Oran(%)
TOKAK	2	33±5	16±3	48
KAYA	2	43±2	26±3	63
VERÇİL	2	43±2	35±4	81
YEŞİLKÖY	6	40±2	6±5	15
GEM	6	43±2	35±4	81

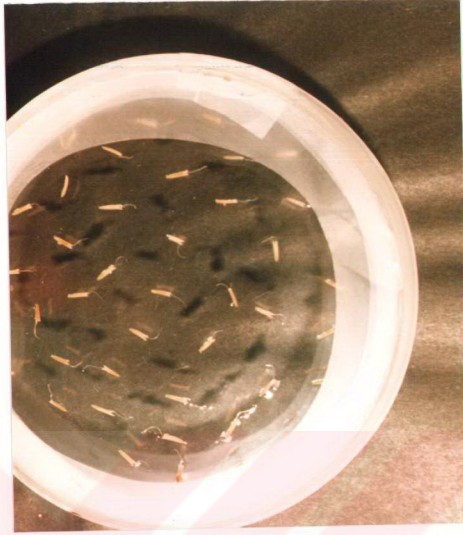
Submakroskopik yapıların mikroskop altında incelenmesi sonucunda kallus ve embriyoidler belirlenmiştir. Mikroskopik inceleme sonucunda kallus (Resim 12,13) ve embriyoid (Resim14) olduğu belirlenen yapıların, makroskopik görünüşleri de fotoğrafa alınmıştır.



Resim 12. GEM çeşidine ait kallusun(K) makroskopik görünümü.



Resim 13. YERÇİL çeşidine ait kallusun(K) makroskopik görünümü.



Resim 14. GEM çeşidine ait embriyoidin(E) makroskobik görünümü.

Mikroskop altında yapılan incelemelerden 15 gün $+4^{\circ}\text{C}$ önuygulama yapılmış anterlerden elde edilen kallus ve embriyoid sayıları Çizelge 4. te gösterilmektedir. Çizelge 4. ten de görüldüğü gibi 2 sıralı arpa çeşitlerinden TOKAK ve YERÇİL'de 15 gün sonra 1'er adet kallus; 6 sıralı GEM'de ise 2 adet kallus görülmüştür. Embriyoid oluşumu ise sadece GEM'de 2 adet olarak gözlenmiştir.

Çizelge 4. Çeşitlerdeki kallus ve embriyoid sayıları.

Çeşit	Kültüre alınan anter sayısı	Kallus sa.	Embriyoid sa.
KAYA	130	-	-
TOKAK	100	1	-
YERÇİL	128	1	-
YEŞİLKÖY	121	-	-
GEM	129	2	2

3.3. SUBMAKROSKOBİK YAPILARIN MİKROSKOBİK GÖRÜNÜMÜ

İnokülasyon'dan 15 gün sonra, belirgin bir uzama gösteren filamentler, mikroskop altında incelenerek fotoğrafı alınmıştır (Resim 15). Filament, kallus ve embriyoid dışında kalan submakroskopik yapıların görünümü de Resim 16.'da verilmiştir.

TOKAK çeşidinden elde edilen kallus'un mikroskopik görünümü Resim 17'de, YERÇİL çeşidinden elde edilen kallus ise Resim 18.'de görülmektedir.

Resim 19 ise GEM çeşidinden elde edilen embriyoidin mikroskopik görünümüdür.

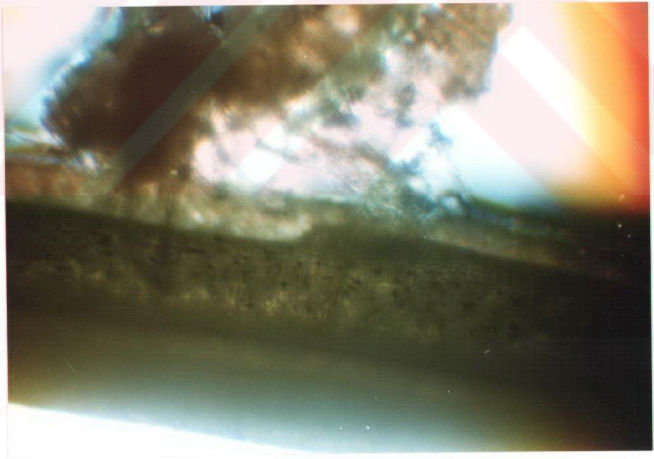
30 günlük önyuğulamalılarda ise yaklaşık 3 hafta geçmesine karşın kallus ve embriyoide rastlanamamıştır.



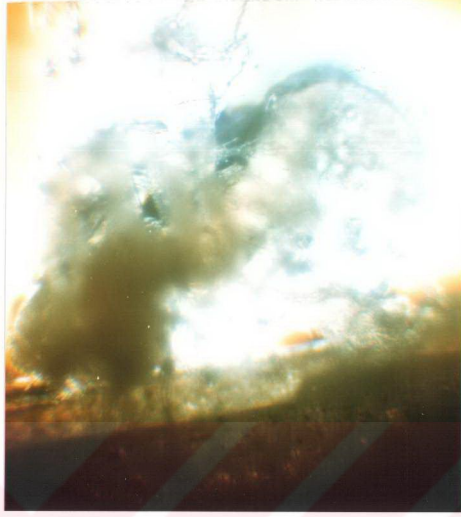
Resim 15. Kültürde uzamış Filamentin mikroskopik görünümü.
($\times 3,2 \times 6,3$).



Resim 16. Diğ er submakroskopik yapıların mikroskopik görünümü.
(x3,2x6,3)



Resim 17. TOKAK çeşidinden elde edilen kallusun mikroskopik görünümü.(3,2x6,3)..



Resim 18. YERÇİL girdidinden elde edilen kallusun mikroskopik görünümü. (x3,2x6,3)



Resim 19. GEM girdidinden elde edilen embriyoid'in mikroskopik görünümü. (x3,2x6,3).

4. TARTIŞMA

Genetik, Fizyoloji, Biyokimya ve Moleküler Biyoloji bilim dallarının ortak olarak çalıştıkları Doku Kültürü Teknikleri son yıllarda çok sayıda uygulama alanı bulmuştur.

Doku kültürü, bitkinin herhangi bir yerinden alınan doku parçasının veya organının ya da izole edilmiş tek bir hücrenin sterilizasyon sonrasında belli ortamlara alınması teknikleridir.

Bu tekniklerden biri olan anter kültürü yöntemi ise özellikle haploid bitkilerin eldesinde önemli bir yer tutmaktadır.

Buna rağmen, ülkemizde bu konu ile ilgili olarak yapılmış hiçbir çalışma yoktur. Bu çalışmalara önderlik etmek amacı ile, arpada anter kültürünün uygulanabilirliğini araştırmaya çalıştık.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar; daha önce yapılan arpa anter kültürü çalışmaları ile paralellik gösterir.

Arpa anter kültürü için; eğer amaç fizyolojik veya biyokimyasal yada genetiksel ve moleküler biyolojik açıdan temel problemleri çözmeye yönelik değilse, seçilecek materyalin iyi bir ıslah materyali olması gereklidir. Böylece klonlanan çeşitte, istenilen iyi karakterlerin seçilmesi sağlanmış olur. Son zamanlarda bazı, araştırmacılar iyi agronomik karakterli melezleri veya varyeteleri kullanmışlardır ve uygulama amacı için anter kültürü çalışması gerçekleştirmişlerdir (HAN, 1991).

Biz de çalışma materyalimizi, gen merkezi Anadolu olan, tarım açısından da önemi bulunan ıslah edilmiş arpa çeşitleri içersinden seçmeye gayret sarfettik. Bunlarında 2 ve 6 sıralı gibi farklı varyetelere ait çeşitler olmasına özen gösterdik.

Deneysel olarak kanıtlanamamasına rağmen genelde tarlada yetiştirilen bitkilerin, büyüme odası veya serada yetiştirilenlere göre daha iyi donör bitkiler oldukları belirtilmiştir (VASIL, 1980). Bitkilerin büyüme ucunda yaklaşık 20.000 lux altında yetişen bitkilerden alınan anterler, daha düşük ışık şiddeti altında büyüyen bitkilere ait anterlere göre çok daha fazla frekanslarda

kallus, embriyoid gibi makroskobik yapılar oluşturduğu ve ayrıca bitki büyümesi süresince, sıcaklığın da kritik etkilere sahip olduğu tanımlanmıştır. 10.000 lux'ten daha düşük ışık şiddeti ile beraber 18-20°C'lık sabit bir sıcaklığın, arpada daha düşük oranda mikrospondan kallus oluşumuna yol açtığı belirtilmektedir. Pest kontrol işlemleri de mikrospor gelişimi üzerine zararlı bir etkiye sahip olabilmektedir (WENZEL ve FEROUGH-WEHR, 1984).

Bizim çalışmamızda da literatürde belirtildiği gibi, tarlada yetiştirilen bitkilerden alınan başakların anterlerine ait mikrosporlardan kallus ve embriyoid gelişimi olmuştur. Serada yetiştirilen bitkilerden alınan başakların kaybının ise; uygun olmayan sera koşulları ve karapas hastalığını önlemek amacı ile kullanılan pestisitlerin varlığından kaynaklanabileceği düşünülebilmektedir.

WENZEL ve FEROUGH-WEHR(1984)'ün belirttiği gibi, istenilen mikrosporları elde etmek ve mikroorganizmalarla olan bulaşmalardan kaçınmak için, başaklar henüz bayrak yapraklarının içindeyken seçilmelidir.

Bu doğrultu ile başak seçimi yapılmasına karşın, başak ve bayrak yaprağı arasındaki açının mikrospor frekansı açısından önemli olduğu farkedilerek, uygun açı ön deneme ile saptanmıştır.

Arpa anter kültüründe, stresin sıcaklığı ve süresi önemlidir. Serinde(13-25°C) uzun süre (HUANG ve SUNDERLAND,1981);4°C'de 21-33 gün ya da 7°C'ta 14-21 gün önuygulama yapılması önerilir Gerçekte her sporda bölünmenin indüklenmesi, başlangıçta 4°C'ta 21 gün bunu takiben, 25°C'ta 24 saat suda tutulan kesilmiş başakların sonucu olarak rapor edilmiştir (SUNDERLAND,1981).

Bizim çalışmamızda da, 15 gün +4°C soğuk ön uygulamasından sonra kültüre alınan anterler embriyoid ve kallus verirken, 30 gün +4°C soğuk önuygulamasında kallus ve embriyoide rastlanmıştır.

Arpa anter kültürü için başlangıç ortamı olarak,Patates Ekstrak-

siyon ortamı II, N_6 mineral tuz ortamı, modifiye MS ve EDAM I ortamları kullanılmaktadır (CHUANG, 1978; CHU, 1978; MURASHIGE ve SKOOG, 1962; SORVARI ve SCHIEDER, 1987).

Bizim çalışmamızda geliştirilmiş N_6 mineral tuz ortamının embriyoid ve kallus verdiğini gördük. Ayrıca VASIL(1980)'in belirttiği gibi filament uzaması ve diğer submakroskobik yapıları da gözlemledik.

Arpa ve çeltik gibi birçok tahıl anterlerinin kallus vermesi için oksin/kinetin oranının oksin lehine olması gerekir. Bu neden ile denememizde hormon derişimleri oksin lehinedir.

İnositol arpa anter kültürlerinde, çok hücreli mikrosporların büyümesi için özellikle yararlıdır. Ortamda aminoasit ve vitaminlerin bulunması androgenesisi teşvik etmektedir (GÜREL ve ark., 1992). Bu nedenle, mineral tuz ortamımız gerekli aminoasit ve vitaminlerle zenginleştirilmiştir. HAN(1991)'e göre, başlangıç ortamında glutamin bulunması yararlıdır ve bizim de 8 mg/l glutamin varlığında elde ettiğimiz sonuçlar verilere uygundur. Ortama eklenen sakkaroz'un derişiminin yüksek olması direk ve gözükür embriyoid oluşumu için, agar miktarının da yarı katı ortama göre olması verimi arttırmaması için gereklidir (SORVARI ve SCHIEDER, 1987; HAN, 1991).

Çalışmamızda bu verilere aynen uyduk ve sonucun olumlu ulduğunu gördük.

Ortamdaki anter sıklığının 10-20 anter/ml olduğı belirtilmiştir, bizde ortama anter yerleştirilmesinde bu olguyu göz önünde bulundurduk (SUNDERLAND, 1981).

Anter yerleştirilmesinde tek lobun ortama temas etmesi halinde verimin yüksek olacağı belirtilmesine karşın, denemelerimiz sırasında bu durum çalışma zorluğu ve bu konudaki literatürün azlığı nedeni ile gözardı edilmiştir (HAMACHI ve ark, 1988).

Kültür koşullarının karanlıkta ve 25°C ta olması gereğı hemen hemen tüm literatür verileri içersindedir. Bu nedenle biz de kültür koşullarını aynen benimsedik.

Tüm literatür verileri doğrultusunda gerçekleştirilen bu çalışma sonucunda yerli çeşitlerimizin de, diğer çeşitler gibi kallus ve embriyoid verme yetkinlikleri gözlenmiş ve böylece embriyoid' den rejenerasyona gidilebilmesinin ön koşulu gerçekleştirilmiştir.

4. ÖNERİLER

Ülkemizde bir ivme kazanmakta olan doku kültür çalışmaları, giderek belli alanlarda özelleşmeye de gerek olduğunu göstermektedir. Üte yandan ıslah çalışmalarının da yeni yöntemlere ihtiyacı vardır. Ülkemizin konumu, doğal ve kültür çeşitlerinin sayıca çokluğu, bu çeşitlerin kendi araştırmacılarımızca çalışılmasını zorunlu kılmaktadır.

Bu nedenlerle, anter kültür tekniklerinin; tüm zorluklarına karşın yılmadan denenmesi gereğine inanıyoruz.

Bu arada özellikle arpa'da, anter kültürü uygulanırken; tarla bitkilerinin ya da kontrollü sera koşullarının kullanılmasının gerektiği, N₆ ortamının kültür koşullarına uyduğu, inokülasyondan önce soğuk önuygulamanın verimi arttırdığı, genotipin verim için önemli olduğu ve uygun evredeki mikrosporu içeren antere sahip başakların seçiminin mutlaka ve mutlaka yapılması unutulmaması gerekli konulardır.

5. ÖZET

Tahıl grubu bitkilerinden Arpa (*Hordeum vulgare* L.)'nın 3 gen merkezinden en önemlisi Anadolu'dur. Arpa ile yapılacak ıslah çalışmalarının da Anadolu'dan kökenlenmesi doğaldır. Islah yöntemleri içersinde, günümüzde kullanılanlardan biri, anter kültür tekniği ile haploidizasyon'dur.

Bu çalışmada yerli arpa çeşitlerinden 2 sıralı Tokak 157/37, Kaya 7794, Verçil 147; 6 sıralı Yeşilköy 387 ve Gem 8889 çeşitleri materyal olarak kullanılmıştır. Anter kültür ortamı ise bazik aminoasitlerden Glutamin eklenerek geliştirilmiş N_6 ortamıdır. Tarla ve seralarda yetiştirilen bitkilerden elde edilen başaklar 15 ve 30 gün $+4^{\circ}C$ 'de soğuk önuygulamasına bırakılmışlardır. Kültür ortamına aktarılan anterleri içeren petriler karanlıkta $25+1^{\circ}C$ 'de mikrobiotron'da bırakılmışlardır.

Kültür ortamına aktarılan 15 gün soğuk önuygulemalı anterlerin 15 gün sonra Tokak, Verçil ve Gem çeşitlerinde kallus, Gem çeşidinde ise embriyoid verdiği gözlenmiştir.

Bu sonuçlara göre, yerli çeşitlerde de anter kültür tekniği ile ıslah yapılabileceği anlaşılmıştır.

6. SUMMARY

Anatolia is a most important gen center of the barley (Hordeum vulgare L.) from the three of them. It's also natural that the improvement studies with barley will be settled down from Anatolia.

One of the actual techniques of improvement is haploidization with anther culture techniques.

In this investigation, native barley varieties two-rowed Tokat 157/37, Kaya 7794, Yerçil 147; six-rowed Yeşilköy 387 and Gem 8889 varieties were used for materials. Anther Culture medium was glutamin(basic aminoasides) added modified N_6 medium. Spikes which were obtained from field and greenhouse plants had been left at $+4^{\circ}\text{C}$ temperature for 15 and 30 days pretreatment.

From 15 days cold pretreatment anthers which were transferred to culture medium, then after 15 days period it was observed calli production from Tokat, Yerçil and Gem varieties and embrioid were induced from Gem variety.

From these results it had been understood that improvement studies would be made with anther culture techniques also with native varieties.

7. LİTERATÜR

- Ball, E., Joshi, P.C. 1965 Observations on Individual Callus of *N. tabacum* in Liquid Culture. *Bot. Gaz.* 126:233-246.
- Bergmann, L. 1960 Growth and Division of Single Cells of Higher Plants in Vitro. *J. Gen. Physiol.*, 43:841-851.
- Bourgin, J.P., Nitsch, N.P., 1967. Obtention de *Nicotiana Haploides* a Partir de Tamines Cultivees in Vitro. *Ann. Physiol. Veg.* a: 377-382.
- Chu, C.C., Wang, C.C., Sun, C.S., Chien, N.F., Yin, K.C., Hsu, C. 1973 Investigation on the Induction and Morphogenesis of Wheat (*T. aestivum*) Pollen Plants. *Acta. Bot. Sin.* 15:1-11.
- Chu, C.C. 1978 The N_6 Medium and Its Applications to Anther Culture of Cereal Crops. In: Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture, 43-45. *Sci. Press. Peking.*
- Chuang, C.C., Quyang, T.W., Chia, H., Chou, S.M., Ching, C.K. 1978 A Set of Potato Media for Wheat Anther Culture. In: Proceedings of Symposium on Plant Tissue Cul., 51-56., *Sci. Press, Peking.*
- Clapham, D., 1971 In vitro Development of Callus From the Pollen of *Lolium* and *Hordeum*. *Z. Pflän.*, 65:285-292.
- Clapham, D., 1973 Haploid *Hordeum* Plants from Anthers in Vitro. *Z. Pflän.*, 69:142-155.
- Czech, H., 1926 Kulture von Pflanzlichen Gevebszellen. *Arch., Exp. Zellf.*, 3:179-199.
- Datta, S.K., 1987 Plant Regeneration by Pollen Embryogenesis from cultured Whole Spikes of Barley (*H. vulgare*). *Theor. Apple. Genet.*, 74:121-124.
- De Buyser, J., Henry, Y., Talep, G. 1985 Wheat Androgenesis Cytogenetical Analysis and Agronomic Performance of Doubled Haploids. *Z. Pflän.*, 95:23,34.
- Emiroğlu, Ü., 1982 Haploidi ve Bitki Islahındaki Önemi. *E.Ü. Zir. Fak. Yayınları*, No:450.

- Engin,G., 1991 *Triticum aestivum* L.(Buğday) Üzerinde Anter Kùltürü Çalışmaları.Y.lisans tezi.,Eskişehir.
- Foroughi-Wehr,B., Friedt,W., 1981 Responsiveness to Anther Culture of *Hordeum vulgare* cv. 'Dissa' and its Parents.Barley Genet.Newsl.,11:50-53.
- Foroughi-Wehr,B.,Friedt,W., 1984 Rapid Production of Recombinant Barley Yellow Mozaic Virus Resistant *Hordeum vulgare* Lines by Anther Culture.Theor.Appl.Genet.,67:377-383.
- Gautheret,R.J.,1939 Action de l'acide Indolacetique sur Les Tissus du Tubercule de Carotte. C.R.Soc.Biol., 130:7-9.
- Guha,S., Maheswari,S.C. 1964 In Vitro Production of Embryos from Anthers of *Datura*. Nature,204:497.
- Gönülşen,N., 1987 Bitki Doku Kùltürleri Yöntemleri ve Uygulama Alanları.Menemen,İzmir.
- Grunewaldt,J., Malezpy,S., 1975 Beobachtungen an Antherecallus von *Hordeum vulgare* L. Z.Pflan.,75:55-61.
- Gürel,A., Tosun,M. Demir,İ., Friedt,W. 1992 Arpa Islahında Haploidi Teknikleri ve Anter Kùltürünün Önemi. Malt Sempozyumu,Konya,25-27,Mayıs,1992.
- Haberlandt,G. 1902 Kulturversuche mit Isolierten Pflanzenzellen Sitzungab.Akad.Wiss.Wien.Math-Natur.KI.,111:69-92.
- Hamachi,Y., Komatsuda,T., Nakajima,K., 1988 Embryoid Formation and Plant Regeneration in Anther Culture of Two-rowed Barley cultivars in Japan. Japan.J.Breed.38(3):363-366.
- Han,H., Li,W.Z., Jung,J.K. 1991 Barley Genetics VI:203-205.
- Huang,B., Sunderland,N., 1982 Temperature-Stress Pretreatment in barley Anther Culture.Ann.Bot. 49:77-88.
- Hunter,C.P., 1985 The Effect of Anther Orientation on the Production of Microspore-Derived Embryoids and Plants of *H.vulgare* cv.Sabarlis.Plant Cell Reports.4:267-268.
- Jones,L.E., Hildebrandt,A.C., Riker,A.J., 1960 Growth of Somatic Tobacco Cells in Mikro Culture.Amer.Jour.Bot.,17:468-475.
- Kameya,T., Hinata,K., 1970 Induction of Haploid Plants from Pollen Grains of Brassica.Jap.S.Breed.20:82-87.

- Kaynak,M., Yürekli,A.K., 1991 *Nicotiana tabacum*'dan Hücre Kültürü Yöntemi ile Nikotin Elde Edilmesi İmkanlarının Araştırılması.E.Ü.Fen Bil.Enst.Der.2(1):43-47.
- Kemmer,E., 1928 Beobachtungen über die Lebensdauer Isolierter Epideirmen.Arch.Exp.Zellf.,7:1-68.
- Knudson,L., 1919 Viabilit of detached Root-Cap CellsAmer.Jour. Bot.,6:309-310.
- Kunkel,W., 1927 Vebe die Kultur von Perianthegeveben.Arch.Exp. Zellf.,3:405-428.
- Kün,E., 1988 Serin İklim Tahılları.A.Ü.Zir.Fak.Yayınları:1032.
- Lutz,A., 1963 Description d'une Techniqua d'Isolément Cellulaire en Vue de l'Obtention de Cultures de Tissus Végétaux Provenant d'une Cellule Unique. C.R.Acad.Soc.256:2676-2678.
- Muir,W.H.,Hildebrandt,A.C, Riker,A.J., 1954 Plant Tissue Cultures Produced from Single Isolated Cells. Science.119:877-878.
- Murashige,T., Skoog,F., 1962 A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assay with Tobacco Tissue Cultures.Physiol.Plant. 15:472-497.
- Nitsch,J.P., Nitsch,C., Loerey,P.P., 1969 Obtention de Mutants a Partir de *Nicotiana* Haploides Issus de Grains de Pollen.C. R.Aca.Soc.269:1650-1652.
- Palsoni,L., Kott,L.S., Beversdorf,W.D., 1988 Large Scale Micro-Spore Culture Technique for Mutation.Selection Stuudies in *Brassica napus*. Can.J.Bot.66:1681-1685.
- Pfeifer,H., 1931 Beobachtungen an Kulturen Nackler Zellen aus Pflanzlichen beerenperikarprien.Arch.Exp.Zellf., 11:424-434.
- Picard,G., De Buyser,J., 1973 Obtention de Plantules Haploides de *T.aestivum* L. a Partir de Cultured d'Anters in vitro. C.R.Acad.Soc. 277:1463-1466.
- Quayang,j.W., Hu,H., Chuang C.C., Tseng,C.C., 1973 Induction of Pollen Plants from Anthers of *T.aestivum* L. Cultured in vitro. Scientia Sinica 16:79-95.

- Skoog, F., Miller, C.O., 1957 Chemical Regulation of Growth and Formation in Plant Tissues Cultured in vitro. Symp. Soc. Exp. Biol., 11:118-131.
- Stewart, F.C., Shantz, E.M. 1955 The Chemical Induction of Growths in Plant Tissue Cultures. The Chemistry and Mode of Action of Plant Growth Substances. Proc. Symp. Wye. Coll. 165-186.
- Sorvari, S., Schieder, O., 1987 Influence of Sucrose and Mellibiose on Barley Anther Cultures in Starch Media. Plant Breed. 99: 164-171.
- Thielman, M., 1925 Veber Kulturversuche mit Spaltöffnungszellen. Arach. Exp. Zellf., 1:66-107.
- Torrey, J.G., 1957 Cell Division in Isolated Single Plant Cells in vitro. Proc. Nat. Acad. Sci., 43:887-891.
- Vasil, I.K., 1980 Androgenetic Haploids. In: Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture Supplement, 11A Int. Review of Cytology. Aced. Press. Newyork, 195-213.
- Wenzel, G., Foroughi-Wehr, B., 1984 Anther Culture of Cereals and Grasses. In: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants (Ed. I.K. Vasil), I:311-327.
- Ye, J.M., Kao, K.N., Harvey, B.L., Roshagel, B.G., 1987 Screening Salt Tolerant barley Genotypes Via F_1 Anther Culture in Salt Stress Media. Theor. Appl. Genet., 77:426-429.