

**T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TUZLU KOŞULLAR İÇİN GELİŞTİRİLEBİLECEK
BUĞDAY GENOTİPLERİNİN ANTER KÜLTÜR TEKNİĞİNE
UYUMU**

Rağbet Ezgi DURAN

Danışman: Prof.Dr. Çiğdem SAVAŞKAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
ISPARTA - 2007**

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	12
2.1. Anter Kültür Metodu.....	12
2.2. Tuz Stresi.....	16
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	21
3.1. Materyal.....	21
3.2. Yöntem.....	21
3.2.1. Donör (Verici) Bitkilerin Yetiştirilmesi ve Toplanması.....	21
3.2.2. Soğuk Ön İşlem.....	22
3.2.3. Kültür Ortamlarının Yapılışı.....	23
3.2.4. Steril Ortamda Yapılan İşlemler.....	25
3.2.5. Rejenerasyon işlemi.....	27
3.2.6. Sonuçların değerlendirilmesi.....	28
4. BULGULAR.....	29
4.1. Soğuk Ön İşlemin Çeşitler Üzerindeki Etkisi.....	30
4.1.1. Soğuk Ön İşlemin Kunduru 1149 Çeşidine Etkisi.....	31
4.1.2. Soğuk Ön İşlemin Berkmen 469 Çeşidine Etkisi.....	31
4.1.3. Soğuk Ön İşlemin DH Berkmen Çeşidine Etkisi.....	32
4.2. Haploid Bitki Rejenerasyonu.....	33
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	34
6. KAYNAKLAR.....	43
7. ÖZGEÇMİŞ.....	52

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TUZLU KOŞULLAR İÇİN GELİŞTİRİLEBİLECEK BUĞDAY GENOTİPLERİNİN ANTER KÜLTÜRÜNE CEVABI

Rağbet Ezgi DURAN

Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Juri: Prof. Dr. Çiğdem SAVAŞKAN (Danışman)
Prof. Dr. N. Münevver PINAR
Yrd. Doç. Dr. Ali İNCE

Bu çalışma, ülkemizde ekonomik önemi olan *Triticum durum* Desf. (makarnalık buğday) (Gramineae)'un 'Kundur 1149', 'Berkmen 469' ve 'DH-Berkmen' genotiplerinin anter kültürüne uygunluğunu belirlemek amacıyla yapılmıştır. Ayrıca farklı süreli önışlem koşullarının genotiplerin kallus oluşum miktarına olan etkisi araştırılmış ve en uygun önışlem süresi ve genotip belirlenmiştir. Berkmen 469 genotipi % 0.62 kallus üretimi ile anter kültürüne en iyi cevap vermiş ve en iyi soğuk önışlem süresi her genotip için 15 gün olarak bulunmuştur. Oluşan kalluslar tuzlu koşullar için genotipler geliştirilebilmesi amacı ile MS kültür ortamına transfer edilmişlerdir.

Anahtar Kelimeler: *Triticum durum* Desf., Gramineae, androgeniz, soğuk önışlem, kallus, tuzluluk.

2007, 52 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

THE RESPONSE TO ANTHOR CULTURE OF WHEAT GENOTYPES FOR IMPROVEMENT IN SALINE CONDITIONS

Rağbet Ezgi DURAN

Süleyman Demirel University Graduate School of Applied and Naturel Sciences
Biology Department

Thesis Committee: Prof. Dr. Çiğdem SAVAŞKAN (Supervisor)
Prof. Dr. N. Münevver PINAR
Asst. Prof. Ali İNCE

In this study, anther culture response to two different landraces (*Triticum durum* Desf. cvs. Kunduru 1149, Berkmen 469) and DH-Berkmen cultivated in Turkey has been investigated. In addition, effect of different period cold pretreatment on the calli production was studied and optimum cold pretreatment period and genotype was found. Berkmen 469 anthers were responded 0.62 % by highest producing calli in the liquid BAC1 medium and optimum cold pretreatment was found 15 day for every genotype. Also, produced calli transferred to MS regeneration media for the genotypes improving for salt conditions.

Key words: *Triticum durum* Desf., Gramineae, androgenesis, cold pretreatment, callus, salinity.

2007, 52 pages

TEŞEKKÜR

Bu alıŐma için beni yönlendiren, katkıda bulunan ve karŐılaŐtıĐım zorlukları bilgi ve tecrübesiyle aŐmamda yardımcı olan Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. ığdem SAVAŞKAN'a teşekkür ederim.

ÇalıŐmalarım sırasında destek ve yardımlarını gördüğüm Biyoloji Bölümü Araştırma Görevlisi değerli arkadaŐım Yasemin COŐKUN'a teşekkür ederim.

1250-YL-06 No'lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi BaŐkanlıĐı'na teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen aileme sonsuz sevgimi ve teŐekkürlerimi sunarım.

Rağbet Ezgi DURAN
ISPARTA, 2007.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

MS	Murashige ve Skoog kültür ortamı
BAC1	Marsolais ve Kasha (1985) tarafından geliştirilen arpa anter kültür ortamı
BAC 3	Szarejko ve Kasha (1991) tarafından geliştirilen arpa anter kültür ortamı
BAD1-3	Trottier vd. (1993) tarafından geliştirilen doku kültür ortamı
FHG	Hunter (1987) tarafından geliştirilen kültür ortamı
LS	Linsmaier ve Skoog tarafından geliştirilen kültür ortamı
M-42	Kao vd. (1991) tarafından geliştirilen kültür ortamı
NAA	Naftalin asetik asit
2,4-D	2,4 dikloro fenoksi asetik asit
IAA	İndol-3-asetik asit
ABA	Absisik asit
IBA	İndol butirik asit
BAP	Benzil amino purin
TIBA	2,3,5-Tri iyodo benzoik asit
DH	Double haploid
mMol	Milimolar
PAA	Fenil asetik asit
mmhos/cm	Milimhos birim santimetre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1 Donör bitkilerin yetiştirilmesi ve toplanması	22
Şekil 3.2 Soğuk önişlem uygulaması	23
Şekil 3.3 Kültür ortamlarının hazırlanması	25
Şekil 3.4 Steril ortamda yapılan işlemler	26
Şekil 3.5 Kunduru 1149 ve Berkmen 469 genotiplerinden elde edilen kalluslar...	29

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 BAC-1 başlangıç ve MS rejenerasyon ortamı bileşenleri	24
Çizelge 3.2 Anter kültürü çalışmasında birbirini izleyen işlemler dizini.....	27
Çizelge 4.1 Genotiplerin anter kültürüne cevabı.....	30
Çizelge 4.2 Farklı ön işlem uygulamalarının kallus oluşumuna etkisi	30
Çizelge 4.3 Kunduru 1149 çeşidinin farklı ön işlem uygulamalarında anter kültürüne cevabı	31
Çizelge 4.4 Berkmen 469 çeşidinin farklı ön işlem uygulamalarında anter kültürüne cevabı	32
Çizelge 4.5 DH Berkmen çeşidinin farklı ön işlem uygulamalarında anter kültürüne cevabı	32

1. GİRİŞ

İlk kez 1953 yılında Tulecke, *Ginkgo biloba* L. bitkisine ait olgun polenlerin kültür koşullarında haploid kallus oluşturmak üzere uyarılabileceğini gözlemlemiştir. 1964 yılında ilk önemli gelişmeyi Guha ve Maheshwari gerçekleştirmiş, *Datura innoxia* Mill. bitkisinin kültüre alınan anterlerinde mikrospordan haploid embriyo oluşumu sağlanmıştır. Sonraki yıllarda Bourgin ve Nitsch (1967), *Nicotiana tabacum* L. türünde anter kültürü yoluyla tam bir haploid bitkiyi elde etmeyi başarmışlardır. Bu aşamadan sonra birçok bitki türünde erkek gametten haploid bitki elde etmek amacıyla çalışmalar yapılmış, günümüze değin yaklaşık 250 farklı bitki türünde *in vitro* androgenesis tekniğinden başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Bajaj, 1983; George ve Sherrington, 1984; Pierik, 1989).

Anter kültürü esas olarak; içerisinde olgunlaşmamış polenleri (mikrosporları) bulunduran anterlerin, tomurcuklarından 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 dönemde iken somatik gelişme yönüne doğru çevrilmekte ve böylece “mikrospor androgenesis” veya sadece “androgenesis” olarak adlandırılan oluşum gerçekleşmektedir.

Bugüne dek Angiospermlerde haploid uyartımın 37 familya, 88 cins ve 247 türde gerçekleştirilebildiği bildirilmektedir (Pierik, 1989). Ancak haploid üretiminin sağlanabildiği bitki cins ve türlerini kesin ifadelerle sınıflandırmak mümkün görülmemektedir. Tek yıllık veya otsu bitkiler anter kültürü beklentilerine az veya çok yanıt verdiği halde, odunsu bitkilerde anter kültüründen elde edilen başarı çok düşüktür. Buğday çeşitlerinin ıslahında önemli bir haploid üretim yöntemi olmasına karşın (Picard vd., 1990), asma (Ağaoğlu vd., 1998) ve elma (Kösali, 2000) bitkilerinde ülkemizde yapılan anter kültürü çalışmalarından kallus gelişimi ve embriyoid benzeri farklılaşmalar elde edilmiş olmakla beraber, haploid bitkiye ulaşmak mümkün olamamıştır.

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 veya birinci polen mitozundan hemen önceki dönemdir. Embriyoların oluşumu için geçen süre, türlere bağlı olarak değişiklik göstermekle birlikte; anterlerin dışına çıkıp çıplak gözle görülebilecek aşamaya gelinceye kadar yaklaşık 3-5 haftalık bir zaman geçmektedir (Bajaj, 1983).

Kültüre alınan anterlerin içerisindeki mikrosporlar değişik gelişme modellerine sahip olabilmektedir. Mikrospor çekirdeği doğal koşullarda normal bir mitoz geçirerek vegetatif ve generatif çekirdeği oluşturmaktadır. *In vitro* koşullarda mikrospor çekirdeği geçirdiği mitoz sonucunda benzer görünümlü iki çekirdeğe sahip olabileceği gibi; bazı polenlerde vegetatif çekirdek bölünerek benzer görünümlü iki çekirdek oluşabilmekte ve bölünmenin devam etmesi sonucunda çok çekirdekli polen şekli ortaya çıkmaktadır.

Çok çekirdekli mikrosporların tersine bazı mikrosporlar birkaç çekirdek bölünmesinin ardından ayrılmaya başlamakta ve tam bir hücre bölünmesi geçirmekte, böylece 40-50 hücreli birer proembriyoya dönüşmektedir. Globular aşamaya gelen embriyo polenin ekzin tabakasından dışarı çıkarak şekillenmeye başlamakta ve zigotik embriyoya benzer bir biçimde değişik gelişme aşamalarını tamamlamaktadır. Kotiledon yaprak taslakları belirmeye başlayan embriyo, 5-6 hafta içerisinde anterlerin içerisinde çıkarak gözle görünme aşamasına ulaşabilmektedir.

Dünyada ilk kültüre alınan bitkilerden olan buğday, dün olduğu gibi bugünde insan ve hayvan beslenmesinde en önemli ürün olmuştur (FAO, 1992; Sezer vd., 1998) ve bu nedenle günümüzde tarımı yapılan kültür bitkileri içerisinde ilk sırada yer almaktadır. Dünyada 675.405.000 ha alanda tahılların ekimi yapılmaktadır. Bu alan içerisinde buğday 213.600.000 ha ekim alanı ile % 31.6 paya sahiptir. Yurdumuz ise çok çeşitli zenginlikleri barındıran şanslı bir coğrafya üzerinde yer almaktadır.

Genellikle tarihi ve doğal zenginliklerimiz olarak özetlenen bu değerlerimizin arasına, hem ekonomik hem kültürel açıdan ülkemizin en önemli ürünlerinden buğdayı eklemek yerinde olur (Yağdı, 2002). 2000 yılında, dünya üretiminin % 3.6' sını karşılayan Türkiye (BM Gıda ve Tarım Örgütü-FAO, 2000), dünyanın en önemli buğday üretici ve tüketici ülkeleri arasında yer alıyor. Tahıllara ayrılan 13.208.000 ha ekim alanının % 65.5'i olan 8.650.000 ha tarım alanında buğday ekimi yapılmaktadır. Bu alandan elde edilen üretim toplamı 16.500.000 ton olup, ortalama verim 190.8 kg/da' dır (Anonim, 2000).

Dünya nüfusunun yaklaşık % 35'inin temel besin maddesi olan buğday, tüm dünyada besinlerden alınan kaloringin % 20'sini sağlamaktadır. Yurdumuzda günlük kalori tüketiminin % 53'ü ekme ve öteki buğday ürünlerinden, kişi başına tüketilen günlük ortalama 2290 kaloringin % 44'ü, 68 gram olan günlük protein tüketiminin 45 gramı (% 66'sı) tahıllardan, özellikle buğday ekmeğinden sağlanmaktadır. Buğday tanesi yaklaşık olarak %65-75 nişasta, %8-15 protein, %1-5 yağ, %1.5-3 şeker, %1-2 kül, %11-13 nem içerir. Buğday tanesinde karbonhidrat, yağ ve proteinin yanında, insan ve hayvan beslenmesinde önemli derecede rol oynayan vitaminler de bulunmaktadır.

Ekonomik öneminin yanında buğday, yurdumuzda toplumsal ve kültürel bir değerdir. Buğday, insan yaşamını ekonomik ve kültürel olarak etkilerken, insanda buğdayın evrimini etkilemiştir. İlk tarım köylerinde ekilen iki çeşit buğday vardı: Siyez (*Triticum monococcum*) ve gernik (*Triticum dicoccum*). Bunlar, yabani atalarına göre biraz daha iri taneli ama yine yabaniler gibi kavuzlu (taneyi sıkıca saran örtü) ve başağı taşıyan sapları yarı kırılğan yapıda türlerdi. Daha sonraki dönemlerde ise iri taneli, uzun boylu ve kavuzsuz, bu nedenle işlenmesi çok daha kolay iki tür ortaya çıkmıştır. Makarnalık buğday (*Triticum durum* Desf.) ve ekmeçlik buğday (*Triticum aestivum* L.). Buğdayın geçirdiği bu genetik ve fiziksel değişiklikler, insanların, yarayışlı özellikteki buğdayları seçerek bir sonraki yıl ekme üzere ayırmaları ile başlayıp zaman içinde birikerek oluşan seçilim baskısının sonucudur. Bugün tüm dünyada ekimi yaygın olarak yapılan yalnız bu iki türdür. Ülkemizde toplam buğday ekim alanlarının yaklaşık 1/3' ünde makarnalık, kalan alanın çoğunluğunda ekmeçlik ve az bir kısmında topbaş buğdaylar yetiştirilirken, yüksek verimli ekmeçlik buğday

çeşitlerinin yaygınlaştırılmasıyla, makarnalık buğday üretiminde azalmalar meydana gelmiştir. Ülkemizde buğday ekim alanlarının yaklaşık %15-16'sı makarnalık buğday için kullanılmaktadır. Dünya buğday üretiminin ise %90'nını ekmeklik, %10'nunu ise makarnalık buğday oluşturmaktadır. Türkiye'nin bazı yüksek bölgelerinde ayrıca çok kısıtlı miktarda da olsa, çoğunlukla hayvan yemi olarak siyez ve gernik tarımına rastlanmaktadır. Dünyanın başka bölgelerinde de yöresel iklim ve toprak koşullarına uygun, kısıtlı miktarda üretimi yapılan başka buğday türleri ya da alttürleri mevcuttur. Ayrıca, Avrupa'daki spelt buğdayı gibi (*Triticum spelta*) geçmişte çok yaygın olarak ekilirken sonradan makarnalık ve ekmeklik buğdaylar ile yer değiştirilen ve kaybolan buğday türleri de vardır ([http:1](http://1)).

Ülkemiz yabancı buğday türlerinin (*Aegilops sp.*) genetik çeşitlilik merkezidir. Orta Doğu ve ona komşu Akdeniz çevresi ile Batı Asya, 22 yabancı buğday türünün yayılım gösterdiği alanlardır. Ancak 14 tür ile bunların en yoğun biçimde bir arada bulunduğu coğrafya ülkemizdir (Van-Slageren, 1994). Ülkemizin her köşesinde rastlayabileceğimiz yabancı buğday türleri, hem buğdayın ıslahı, yayılışı ve evrimi ile ilgili çalışmalarda hem de günümüzdeki makarnalık ve ekmeklik buğdayların kalitelerinin artırılması amacı ile yapılan genetik iyileştirme çabalarında büyük önem taşımaktadır. Günümüze ait yabancı ve ilksel (siyez) buğday örnekleri üzerinde yapılan çalışmalar, Diyarbakır'daki Karacadağ bölgesinin, siyez çeşidi buğday tarımının ilk başladığı yer olduğunu göstermiştir (Heun, 1998). Bu önemli çalışma, ülkemizdeki buğday varlığı ve çeşitliliği üzerine kapsamlı araştırmalar yapılması gereğini göstermektedir. Böylece, ülkemizin buğday tarihi, gelişimi ve iyileştirilmesi konularındaki henüz keşfedilme aşamasında olan büyük potansiyelini kullanma olanağı doğacaktır.

Nüfusumuzun her geçen yıl artmasına paralel olarak bitkisel üretimimizi de artırma zorunluluğu kendiliğinden ortaya çıkmaktadır. Buğday üretimini arttırabilmek için ekim alanı veya birim alandan üretilen ürünün, yani verimin artırılması gerekmektedir. Ekim alanını arttırarak günümüzde bu soruna önemli bir çözüm getirmek mümkün değildir. Çünkü ülkemizde pek çok yerde işlenebilecek alanların üst sınırına gelinmiştir. Bu yüzden çözüm, birim alandan elde edilen verimin

arttırılması olarak görülmektedir (Sezer vd., 1998; Yağdı, 2002). Ancak bu çeşitlerin yüksek verimleri yanında çevre koşullarına karşı stabil bir performans göstermeleri verimliliğin devamlılığı açısından önemlidir. Çünkü buğdaydan birim alandan elde edilen tane verimine; çeşit, ekoloji ve yetiştirme yöntemleri (gübreleme, sulama, ekim yöntemleri vs.) önemli ölçüde etki etmektedir (Özgen, 1991). Verimin arttırılması için bölge koşullarına uygun çeşitlerin elde edilmesi, bu çeşitlerin üretime alınması, tarımsal uygulamaların zamanında ve yeterli ölçüde yerine getirilmesi kaçınılmazdır. Günümüzde buğdayda sağlanan üretim artışı çeşitlerin verimlerinin yüksek olmasından kaynaklandığı gibi uygulanan bazı ıslah yöntemlerinin de önemi büyüktür. Ancak artan nüfusun beslenme ihtiyacının giderilebilmesi için verimin daha da yükseltilmesi gerekmektedir. Bu nedenle verim kabiliyeti yüksek çeşitlerin elde edilme isteği ıslahçıların temel amacı olmuştur.

Günümüzde buğday ıslahında birçok yöntemden yararlanılmakta olup, her geçen gün yeni özellikler taşıyan çeşitlerle verim ve kalite artışına katkıda bulunmaktadır. Uygulanan ıslah yöntemleri klasik ve biyoteknolojik yöntemler olarak 2 ana başlık altında toplanmaktadır. Klasik yöntemler; introüksiyon, seleksiyon, melezleme, mutasyon ve poliploidi olarak sıralanmaktadır. Ancak her yöntemin kendine özgü sorunları vardır. İntroüksiyon'daki en önemli sorun; yeterli adaptasyon denemeleri yapılmadan çeşitlerin getirilmesi ve sonuçta da istenilen başarının elde edilememesidir. Seleksiyon çalışmalarında ise, çeşit ıslahının uzun yıllar sürmesi başlıca sorun olup, olası salgın bir hastalığa karşı kısa sürede çözüm üretilemez. Melezleme de bazı sorunlar bulunmakta olup, türler arasındaki izolasyon ve uzun yıllar seçmelerin yapılması önemli olanlardır. Mutasyon ıslahında ise, yapılan çalışmaların amaçları ve etkinliği tam olarak ortaya konulamamaktadır. Çünkü uygulanan mutagenlerin genetik materyal üzerinde ne gibi bir değişikliğe neden olacağı kesin olarak önceden bilinmemektedir (Şehirli ve Özgen, 1988).

Biyoteknolojik yöntemler ile bitkilerin tarımsal niteliklerinin geliştirilmesi amacıyla laboratuvar koşullarında uygulanan doku kültürü teknikleri, zamanla tarla koşullarında yapılan çalışmalarda karşılaşılan sorunların giderilmesinde kullanılmaya başlanmıştır. Sonuçların daha kısa sürelerde alınabildiği, bitkilerin hücre, doku ve

çeşitli organlarının kullanıldığı bu çalışmalarda, bitkilere biyoteknolojik sistemler için geliştirilmiş tüm yöntemler uygulanabilmektedir. Doku kültürü çalışmalarında bitkilerin kendilenme ya da karşı döllenme ile eşeysel olarak çoğalabilmelerinin yanı sıra gövde, dal, yaprak gibi herhangi bir parçalarından eşeysiz olarak da çoğalabilme (totipotensi) özelliği, onların *in vitro* koşullarda uygun besin ortamı içeriğiyle tüm bitki şeklinde gelişmelerini olası hale getirmektedir. Mikroorganizmalardan arındırılmış bir ortamda ve dengeli şekilde hazırlanmış besin maddeleri tek bir anaçtan istenildiği kadar çoğaltım yapılmasını sağlamaktadır. Doku kültürü tekniklerinin bitkilerin genetik potansiyellerinin amaca uygun yönlendirilmesi açısından büyük önem taşıdığı anlaşılmaktadır. Buğdayın klasik ıslahındaki mevcut sorunları aşabilmek için, doku kültürü ve biyoteknolojik yöntemlerden yararlanmak kaçınılmazdır (Özgen ve Akar, 1993).

Yıldırım vd. (1979), adaptasyon kavramını, genotiplerin çeşitli çevre koşullarına uyabilme yetenekleri olarak, stabiliteyi ise çevre şartlarında yapılacak bir değişikliğin, genotipler üzerine yapacağı etkinin daha önceden tahmin edilebilme durumu olarak tanımlamaktadırlar. Stabilite değeri yüksek çeşitlerin genel ortalamadan daha üstün verim değerlerine sahip olduğu ve belli bir çevrede üstün verim gösteren çeşitlerin özel adaptasyon yeteneklerinin iyi olduğu kabul edilmektedir (Finlay ve Wilkinson, 1963).

Bitkiler yaşamları süresince birçok stres faktörü ile karşılaşmaktadırlar. Bitki üzerinde ender olarak tek başlarına etki yapabilen bu stres faktörleri, genellikle etkilerini eş zamanlı olarak gerçekleştirmektedirler. Biyotik (patojen, diğer organizmalarla rekabet vb.) ve abiyotik (kuraklık, tuzluluk, radyasyon, yüksek sıcaklık veya don vb.) stresler, ekonomik önemi olan tahıllar dahil, tüm bitkilerin normal fizyolojik işlevlerinde değişikliklere yol açmaktadır. Tüm bu stresler bitkilerin biyosentetik kapasitelerini azaltır, normal fonksiyonlarını değiştirir ve bitkinin ölümüne yol açabilecek zararlara neden olabilir (Lichtenhaler, 1996).

Tarım yapılan alanlarda verimliliği olumsuz yönde etkileyen etmenlerden en önemlisi tuzluluktur (Dinç vd., 1993). Ülkemizin genelinde bulunduğu sıcak

ve kurak iklim koşulları, tuzluluk ve çoraklığın oluşumu için ideal ortamı oluşturmaktadır. Düşük yağış miktarı ile eriyen tuzlar, fazla sıcaklığın etkisi ile bitkilerin etkin olarak kullandığı alanlarda çökelmekte veya toprak yüzeyinde birikerek tuz tabakaları oluşturmaktadır. Ülkemizde bu alanlar özellikle yükseklerden gelen sel sularının toplandığı düz ovalarda görülmekte, dolayısıyla rutubet rejimi ve toprak kalitesi yönünden tarıma en elverişli alanlar, tuzluluk sorunundan dolayı kullanılamaz hale gelmektedir (Eyüpoğlu, 1999). Dünyada her yıl 10 milyon ha arazinin tuzluluk etkisiyle elden çıkması sorunun boyutunu daha iyi göz önüne sermektedir. Özellikle kurak ve yarı kurak iklim bölgelerinde yetersiz yağış ve yüksek buharlaşma tuzluluğun başta gelen sebeplerindedir. Öte yandan yanlış sulama uygulamaları da özellikle drenaj koşullarının kötü olduğu yerlerde tuzluluğa sebep olabilmektedir (Ergene, 1982). Dünyada tarım arazilerinin sınırlı olduğu ve besin ihtiyacının katlanarak arttığı dikkate alınır en azından mevcut arazilerin daha verimli kullanılması gerektiği ortaya çıkar. Bu yüzden tuzlu toprakların ıslahı ve ekonomik bir şekilde değerlendirilmesi son derece önemlidir (Woods, 1996).

Tarım alanlarının ve su kaynaklarının tuzlanarak kaybedilmesi gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde uzun yıllardır uygulanan entansif tarımın doğal bir sonucu olarak ortaya çıkmıştır. Doğru olanı, bu uygulamalar yerine, daha sürdürülebilir tarım tekniklerine ve su kullanımına yönelmektir. Örneğin, çok yıllık bitkilerin ve ağaçların karışık kullanıldığı yetiştirme şekliyle, üst toprak tabakalarında daha az sodyum ve diğer tuzların birikimi sağlanabilecektir. Ancak, bu tür bir yeni tarım sistemine geçmek uzun sürelerde gerçekleşebilecek zor bir işlemdir. Oysa tuza dayanıklı bitkiler geliştirmek ve tarımda kullanmak geçici, ancak en azından kısa sürede sonuç verecek pratik bir çözüm yolu olarak dikkati çekmektedir (Avcıoğlu vd., 2003).

Son yıllarda bitki fizyologları ve ıslahçıları, kültür bitkileri çeşitlerinin tuza dayanıklılık açısından varyasyonlarına eğilmiş ve saptadıkları farklılıklardan yararlanarak, tuza dayanıklı çeşitler ortaya koymuşlardır (Maas vd., 1977; Katsuhara vd., 1990). Bitki fizyologları ise bu dayanıklılığın moleküler temellerini açıklamaya

çalışmaktadır (Soldatini vd., 1985; Edreva, 1998). Bitkilerin tuz, vb stres faktörlerine dayanıklılıkta iki yol izlediklerini, ilkinin 'Kaçınma' olduğunu açıklamaktadırlar. Bu amaçla bitkiler, yapılarında morfolojik ve kimyasal değişiklikler gerçekleştirmektedirler. İkinci dayanıklılık mekanizması ise 'Tolerans' dır, yani stres faktörünün etkisini azaltma çabasıdır ve bu amaçla hücre ve doku seviyesinde değişiklikler gerçekleştirilir. Örneğin, hücre duvarının güçlendirilmesi (membran dayanıklılığı), sekonder metabolit üretimi ve prolin gibi stres proteinlerinin sentezlenmesi bunların başında gelmektedir. Tuz stresine dayanıklılığın önemli bir göstergesi olan 'Zar dayanıklılığı', stres koşullarında bitki dokularında açığa çıkan serbest iyon miktarını saptayarak ölçülebilmekte, bu açıdan doku ekstraksiyonlarının elektriksel geçirgenliğini, mmhos/cm cinsinden ölçmek en sağlıklı göstergeyi oluşturmaktadır (Poljakoff-Mayber ve Gale, 1975).

Tuzluluk; özellikle kurak ve yarı kurak iklim bölgelerinde yıkanarak yer altı suyuna karışan çözülebilir tuzların yüksek taban suyu ile birlikte kapillerite yoluyla toprak yüzeyine çıkması ve buharlaşma sonucu suyun uçmasıyla toprak yüzeyine çıkması ve toprak yüzeyinde birikmesi olayıdır. Bu birikme toprak yüzeyinde olabileceği gibi yüksek sıcaklık etkisiyle yüzeyden daha aşağıda da olabilmektedir.

Tuzlulaşmaya neden olan anyonlar; tuzlu topraklarda en fazla rastlanan anyonlar, Cl^- ve SO_4^{2-} anyonlarıdır. Nadiren de olsa HCO_3^- , CO_3^{2-} ve NO_3^- anyonları bulunabilir. Katyonlar; Tuzlu topraklarda en fazla bulunan katyonlar, Na^+ , Ca^{2+} ve Mg^{2+} katyonlarıdır. Genellikle az miktarda da K^+ katyonu bulunabilir.

Tuzlulukta etkili olan unsurlar okyanuslar, ana materyal, topografya ve iklim olarak sınıflandırılabilir.

Okyanuslar daha ziyade sahil kesimlerde ve okyanus kenarlarındaki delta ovalarındaki tuzluluğun kaynağıdır. Okyanusların tuzlu suyu, gel-git olayları, deniz serpintileri ve tuzlu suyun arazilere nüfuzu yoluyla bu topraklara ulaşır ve buharlaşma sonunda toprak yüzeyinde tuz birikmesi olur.

Dünya üzerindeki tuzluluğun en önemli kaynağı ana materyaldir. Zira yüzey ve taban suyu akışı sırasında ana materyaldeki çözünebilir tuzların yer altı ve yer üstü sularına karışması tuzluluğun temel kaynağıdır. Ana materyalde tuz iki şekilde bulunabilir; Deniz orijinli kayalar, daha önce deniz tabanı olan ancak jeolojik olaylar sonucu suyu çekilen bölgelerde yıllarca tuzlu deniz suyuna maruz kalan kayalar tuzluluk kaynağıdır. Mineral ayrışmalar, ana kayada mevcut bulunan tuzlar, sular ve diğer kimyasal ve fiziksel etkilerle ayrışır ve tuzluluğa sebep olurlar.

Tuzluluğun oluşmasında önemli bir faktörde topografyadır. Kapalı havzalar genellikle tuzlaşma eğilimindedir. Özellikle taban suyu akışını engelleyen geçirimsiz tabakalar yüksek taban suyunun ve dolayısıyla tuzluluğun başta gelen sebeplerdendir.

Tuzluluk daha ziyade kurak ve yarı kurak bölgelerde sorun olmaktadır. Zira yağışlı bölgelerde fazla yağışla yer altı suyuna iletilen tuzlar akarsularla denizlere ulaştırılır. Ancak kurak ve yarı kurak bölgelerde tuzların yıkanması ve taban suyuna karışması yetersiz yağış nedeniyle yereldir ve çoğu zaman yer altı suları açık denizlere ulaşamaz. Bunun sonucunda da lokal kapalı havzalar meydana gelir. Ayrıca yüksek buharlaşma kurak ve yarı kurak bölgelerdeki tuzluluğun en önemli sebeplerindendir (Ergene, 1982).

Topografya ve uygulamalar yönünden tuzluluk, kanal sızıntılarının sebep olduğu tuzluluk ve sulama uygulamalarının sebep olduğu tuzluluk olmak üzere ikiye ayrılır.

Kanal sızıntılarının sebep olduğu tuzlulukta gerek sulama ve gerekse drenaj kanallarında meydana gelen sızıntılar uzun süre sonunda buharlaşmanın da etkisiyle kanal civarında tuz birikmesine sebep olabilmektedir.

Sulama uygulamalarının sebep olduğu tuzluluk genel olarak üç grup altında toplanabilir;

1. Tuz içeriği yüksek sulama suyu kullanılması nedeniyle oluşan tuzluluk,

2. Aşırı sulama nedeniyle yer altı su tablasının yükselmesine neden olarak meydana gelen tuzluluk ve
3. Sulama uygulamalarının neden olduğu tuzluluk (Woods, 1996).

Bitki hücrelerinin yarı geçirgen zarları, bitki besin maddelerini alırken sınırlı bir osmotik basınca sahiptir. Dış ortamdaki tuz yoğunluğunun bunun üzerinde olması halinde, toprak çözeltisinden bitkiye doğru olan besin maddeleri akımı tersine döner, bitkiden toprağa doğru yönelir, bunun sonucu olarak bitkiler ölür. Kök bölgesinde tuz yoğunluğunun artması sonucu, bitkilerin kök bölgesindeki mevcut sudan yararlanabilme kapasiteleri çok azalır. Ortamda su olmasına rağmen bitki susuzluktan ölür (Turan ve Sezen, 2002).

Tuz stresinde bitkilerde aşırı derecede biriken sodyum (Na), potasyumun (K) alınımını engellemekte (Siegel vd., 1980), ve klor (Cl) ise özellikle NO₃ alımı üzerinde olumsuz etki yaparak (Kirkby ve Knight, 1987; Günefl vd., 1994; İnal vd., 1995) bitkilerde iyon dengesinde bozulmalara sebep olabilmektedir (Lewitt, 1980). Buna karşın, bitki dokularında sodyuma göre daha fazla oranda akümüle (biriken) olan klor ise yapraklarda zararlanmalara yol açarak fotosentezi dolayısıyla ürünü olumsuz yönde etkileyebilmektedir (Hajrasuliha, 1980).

Tuzlu topraklarda yetiştirilen bitkilerde, ürünlerdeki azalmaya neden olarak toprakta artan osmotik potansiyelden dolayı bitkinin suyu yeteri kadar kullanamaması veya tuzlu topraklarda aşırı miktarda bulunan Na ve Cl gibi iyonların neden olduğu toksik etki ve bitki iyon dengesindeki bozulmalar gösterilmektedir (Flowers ve Yeo, 1981; Lewitt, 1980). Sodyum ve klor iyonlarını daha az oranda absorbe eden bitki çeşitlerinin tuz stresine daha fazla dayanıklı olduğu bildirilmiştir (Flowers vd., 1977; Van Steveninck vd., 1982). Tuzluluğun yarattığı osmotik stres sonucunda sitoplazmanın osmotik potansiyeli prolin, betain ve sükroz gibi organik bileşiklerin birikimi ile sağlanmaktadır (Pardha Sarahi ve Mohanthy, 1993). Bitkilerin prolin içerikleri ile tuz stresine dayanıklılıkları arasında pozitif bir ilişkinin olduğu belirtilmiştir (Kumar ve Sharma, 1989; Chowdhury vd., 1995). Günefl ve ark. (1994) tuz stresinde yetiştirilen buğday bitkisinin tuza dayanıklı olan çeşitlerinin sodyum ve

klor içeriklerinin düşük; potasyum, prolin ve klorofil içeriklerinin ise daha yüksek olduğunu saptamışlardır (Günefl vd., 1994).

Tuz toleransı, tuz stresine dayanıklılığın protoplazmik bir komponentidir. Bu, protoplazmanın ait olduğu bitki türüne, doku tipine ve dirençliğe bağlı olarak, tuz stresi ile bir arada olan iyonik dengesizliği ve artan iyon konsantrasyonlarının ozmotik etkilerini tolere edebildiği dereceyi kapsamaktadır. Familya, cins ve türler arasında, hatta aynı türe ait çeşitler arasında tuza toleranslılık bakımından da farklılıklar bulunmaktadır (Çopur ve Oğlakçı, 1995).

Bitkilerin tuzluluğa karşı toleransı, genellikle üç şekilde değerlendirilmektedir:

- a) Tuzlu topraklarda bir bitkinin yaşamını sürdürebilme yeteneği,
- b) Mutlak bitki büyümesi ve verim,
- c) Tuzlu topraklardaki tuzlu olmayan topraklarla karşılaştırılan nispi büyüme veya verim (Maas, 1986).

Buğday dünyada stratejik önemi olan bir bitkidir. Makarnalık buğdayın ise özellikle Akdeniz ülkelerinde tarımı yapılmaktadır ve sanayi ve teknolojik önemi vardır, besin değeri ekmeçlik buğdaya göre daha yüksektir. Diğer yandan, gerek iklim değişikliğinin ülkemiz topraklarında da artarak yaşandığı gerekse sulamanın üretici tarafından aşırı kullanıldığı günümüzde, tuzluluk, bir problem olarak tarımsal alanları etkilemektedir. Yukarıda belirtilen nedenlerle bu çalışma, bir biyolojik teknik olan anter kültürünün, tuzluluğa karşı dayanıklılık gösterebilecek makarnalık buğday genotipleri geliştirmede, bu genotiplere uyumunu araştırmak üzere yapılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Anter Kültür Metodu

Xu vd. (1981), *Hordeum vulgare* var. 'Sabarlis' çeşidini anter kültürü metodunu kullanarak yüksek verimle elde etmişlerdir. Sabarlis anterleri içerik bakımından önceden uygun hale getirilmiş ortama ml başına 10-20 adet yoğunlukta olacak şekilde aşılanmıştır. Bu yüksek verim başaklardaki anterlerin tek hücreli polen safhasında alınması ile elde edilmiştir. Kesilen başaklar 14 gün +7 C°'de önişleme tabi tutulduktan sonra alınmıştır. Anterlerin genç tek hücreli polen safhasında 7 gün önişleme tabi tutulması en etkili uygulama olmuştur. Sabarlis ovaryumları bu koşullarda anterlerden daha etkili olmuştur fakat çenekler ve başağın diğer parçaları kısmen etkisiz bulunmuştur. Çavdar, mısır, tütün ve arpanın diğer genotipleri Sabarlis anterlerinden daha az etkili olmuştur.

Lashermes vd. (1991), Batı Asya ve Kuzey Afrika'nın kuru alanlarına adapte olmuş buğday genotiplerinin anter kültürüne cevabını değerlendirmişlerdir. Genetik çeşitlilik göz önünde tutularak gözlem yapılmıştır. Bununla beraber, bütün cevapların ıslah programındaki pratik kullanımı dikkate alınmıştır. Çalışmada 'Pavon' çeşidi ve CIM- eksplantının 8 hibrit çeşidi kullanılmıştır. Embrioid oluşumu için MS ve SKC içeriği kullanılmış ve 2,4-D ile desteklenmiştir. Verici bitkilerin yetiştirildiği sıcaklık koşullarının, albino bitkilerin meydana gelme sıklığıyla bağlantılı olduğu bulunmuştur. Ayrıca ortamdaki maltoz etkisinde test etmişlerdir. Sükroz yerine maltoz kullanımının etkisi genotipe bağlı olarak değişmektedir. Maltoz kullanımında da sükroz kullanımında da birkaç genotipin anter kültürüne iyi cevap verdiği ve bütün genotiplerinde yeşil bitki üretimine kabiliyetli olduğu bulunmuştur. En iyi embrioid oluşumu ve bitki rejenerasyonu Seri 82 x Veery/Sunbird genotipinde görülmüştür. Seri 82 x Veery/Sunbird, Hodhod x Sudan, Sunbird genotiplerinde bitki rejenerasyonu sükroz kullanıldığında; Egud 14 x Roshan, Sunbird x Clement/Alondra, Chm4 x 76529S5-3 genotiplerinde ise maltoz kullanıldığında daha iyi sonuç vermiştir.

Yine Lashermes vd. (1992), *T. aestivum* türünün 'Veery's' ve 'Hodhod' çeşitlerinin anter kültürü metoduyla elde edilen bitki rejenerasyon oranlarını araştırmışlardır. Ana ortam olarak 750 mg/l glutamin ve 165 mg/l NH₄NO₃ içeren modifiye edilmiş MS ortamı kullanılmıştır. Embriyoid oluşumu için 0.5 mg/l 2,4-D, 30 g/l maltoz ve 60 g/l arpa nişastası içeren ortam kullanılmıştır. Örnekler 27°C sıcaklıkta karanlıkta inkübe edilmiştir. 21-28 gün sonra polen embriyoidleri ve bitkiler sayılmıştır. Embriyoidler 34.2 g/l sükroz ve 1 mg/l IAA eklenmiş rejenerasyon ortamına transfer edilmiştir. Arpa nişastası jel ortamının oldukça yumuşak olduğu ve anterlerin batma eğiliminde olduğu görülmüştür. Bu deneyde farklı katılaştırıcı ya da hareketli (kaygan) ajanların etkileri karşılaştırılmıştır. Her denemede minimum 60 anter kültüre alınmıştır. Ortamda arpa nişastası kullanımı hem embriyoid oluşumunu hem de bitki rejenerasyonunu etkilemiştir. Agaroz gibi katılaştırıcı ajanların varlığı embriyoid oluşumunu arttırmıştır. Ficoll kullanılan ortamda anterler ortam yüzeyine dizilmiştir. Çift katlı ficoll ortamı direk bitki oluşumunda ve rejenerasyon ortamına transfer edilen embriyoidlerin iyi bir rejenerasyon kabiliyetine sahip olmalarında etkili olmuştur. Yeşil ve albino bitki oranı çeşitli ortamlar arasında büyük farklılıklar göstermiştir.

Saidi vd. (1997), durum buğayının 16 çeşidinin ve bir F₁ hibridinin (Haj Mouline x 1728) anter kültürü metodu ile embriyo oluşum ve rejenerasyon kapasitesini araştırmışlardır. Başaklar uygun zamanda toplanmış ve anterler mikrosporlar tek çekirdekli safhada iken kültür ortamına alınmıştır. Genotipin anter kültürüne olan etkisini araştırmak için her genotipten ortalama 600 anter kullanılmıştır. Soğuk önışlem uygulamasının etkisini araştırmak içinse başaklar 0, 2, 4-6, 8 ve 15 gün süre ile 3°C sıcaklıkta tutulmuştur. Her uygulamada 12 genotip ve 4 farklı kültür ortamı kullanılmıştır (C17, BPTG, P₂ ve N6). Androjenetik embriyolar, 1-2 ay sonra oluştuklarında çeşitli düzenleyici maddelerin ve aminoasitlerin eklenmiş olduğu R9, C17 ve N6 rejenerasyon ortamlarına transfer edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda genotipin androgenesis kapasitesi üzerinde oldukça fazla etkisi olduğu gözlenmiştir. Test edilen 17 genotip içinde, en yüksek '1726' çeşidi % 25.37 ve en düşük '1715'

çeşidi % 3.17 oranında embriyo oluşturmuştur. Soğuk önişlem deneyinde, C17 ortamına alınan ve 8 gün soğuk önişleme maruz bırakılan başaklardan alınan anterlerin en iyi verime sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca test edilen 4 ortam içinde C17 ortamının diğer üç ortamdan çok daha iyi sonuç verdiği sonucuna varılmıştır. En yüksek rejenerasyon oranı sırasıyla % 20.07 ile C17 ortamında, % 15.17 ile R9 ve % 10.7 ile N6 ortamlarında görülmüştür. Embriyonun oluşumundan 21 gün sonraki periyot bitki rejenerasyonu için en uygun zamandır ve rejenerasyon oranı bu periyotta yaklaşık % 60 olarak bulunmuştur.

Savaşkan vd. (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 önişlemin etkisi araştırılmıştır. Anter kültürü için kullanılan başaklar, mikrosporlar tek çekirdekli safhadayken toplanmış, 21 günlük soğuk önişlemden sonra %2'lik asetokarmin ile kontrol edildikten sonra anterler kültür ortamlarına alınmıştır. 3 cm'lik petrielerde bulunan kültür ortamlarına ml başına ortalama 10-20 adet olarak konulan anterler, $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklık ve karanlıkta inkübasyona alınmıştır. BAC3 ortamı FHG ortamından daha iyi sonuç vermiştir. BAC3 ortamında, 21 gün soğuk önişlemden 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.

Slim-Amara vd. (1999), 6 makarnalık buğday çeşidi anterlerini, kallus ve yeşil bitki rejenerasyonu kabiliyetlerini belirlemek için iki farklı ortamda kültüre almıştır. *In vitro* kültür esnasında mikrospor gelişiminin sitolojik analizleride gerçekleştirilmiştir. Deneyde iki kültür ortamı karşılaştırılmıştır. 1. ortam Batı Asya ve Kuzey Afrika'nın (WANA) kuru alanlarına duyarlı buğday genotipleri için kullanılan ortamdır ve diğer ortamdan farklı olarak 0.5 mg/l kinetin ve 100 mg/lit PAA içermektedir. Durum buğdayında tek çekirdekli (uninucleate) mikrospor gelişimi 2 farklı spor bölünmesi yolu aracılığıyla meydana gelmektedir. Bunlar

dominant simetrik bölünme (B yolu) ve daha az görülen asimetrik bölünme (A yolu)'dur. Bu bölünmeler mikroyapıların kallus karakteri sergilemesine ya da embriyoid üretmesine neden olur.

Kallus oluşumu ve yeşil bitki rejenerasyonu oranında çeşitler ve ortamlar arasında önemli farklılıklar bulunmuştur. 1. ortamda kallus oluşum oranı Khiair çeşidi için % 1.6 iken Jeneh-Khotifa çeşidi için % 2.1 bulunmuştur. Yeşil bitki rejenerasyon sıklığı Om Rabia çeşidinde % 83.1 iken Azizi çeşidinde % 63.1 bulunmuştur. Khiair, Azizi ve Jeneh-Khofita çeşitleri anter kültürüne diğer çeşitlerden daha iyi cevap vermiştir.

Doğramacı-Altuntepe vd. (2001), durum buğdayının (*Triticum turgidum* L., $2n=4x=28$; AABB) 10 çeşidinin (Gediz-75, Sham-1, Cosmidor, Kunduru-1149, Ege-88, Çakmak-79, Diyarbakır-81, Fenike, Dicle-74 ve Kızıltan-93) anter kültürüne cevabını araştırmışlardır. Her deneme bu 10 genotip, 2 g/l fruktoz, 4 g/l glukoz, 50 g/l sükroz ve 130 g/l ficoll ile modifiye edilmiş 4 başlangıç kültür ortamı [BAC1 (Marsolais ve Kahsa, 1985), BAD-1, BAD-3 (Trottier vd., 1993) ve M-42 (Kao vd., 1991)] ve 3 büyüme koşulu (sera, tarla ve büyüme odası) kullanılarak kurulmuştur. Donör bitkiler serada 20-23 °C sıcaklıkta, % 60 nem ve 16 saat gündüz periyodunda ve tarla koşullarında yetiştirilmiştir. Olgunlaşmamış başaklar 7 gün +4 °C sıcaklıkta soğuk önışleme tabi tutulmuştur. Daha sonra % 70 etil alkol, % 1 sodyum hipoklorit, Tween 20 ve saf su ile yüzey sterilizasyonları yapılan başaklardan alınan anterler 5 ml'lik kültür ortamlarına 20'şer adet olacak şekilde ekilmiş ve 28 °C sıcaklıkta karanlıkta inkübe edilmiştir. Kültürlerin her hafta kallus ve embriyoid gelişimleri gözlenmiştir. Oluşan kallus ve embriyoidler (1-2 mm), 30 g/l sükroz, 17.5 g/l glukoz ve 8 g/l agar içeren BAD-1 rejenerasyon ortamına alınmıştır. Bu kültürler 7-10 gün oluşum koşullarında tutulduktan sonra 25 °C sıcaklık ve 16 saat gündüz periyodu koşullarına ayarlanmış inkübatöre alınmıştır. Bitki rejenerasyonu meydana geldikten sonra oluşan fideler 2 g/l kinetin, 1 g/l IAA ve 30 g/l maltoz içeren MS ortamına transfer edilmiştir. 10 genotipten alınan toplam 86,400 anterin % 0.49'u (424 anter) kültürü başarılı olmuştur. En iyi genotip %1.28 kallus üretimi ile Dicle-74 olurken en düşük oran % 0.06 ile Çakmak-79 çeşidinde görülmüştür.

Hassawi vd. (2005), 5 buğday çeşidinin (Hourani Nawawi, Hourani 27, Acsad 65, Deir Alla, F8) anter kültürü ile doubled haploid üretim oranlarını araştırmışlardır. Her çeşit için her başaktan 20-25 anter aseptik koşullarda alınmış ve ilk sıvı kültür ortamına alınmıştır. Kültür ortamındaki anterler 28°C sıcaklıkta ve karanlıkta kallus oluşumuna kadar bekletilmiştir. Oluşan kalluslar daha sonra inorganik ve organik maddeler, 1 mg/l indol-3-asetik asit, 2 mg/l kinetin ve % 3 sükroz içeren agarlı rejenerasyon ortamına alınmıştır ve fideler oluşana kadar burada tutulmuştur. Kallus oluşum süresi en az 33 gün olarak tespit edilmiştir. Bu süre en kısa F8 çeşidinde 30 gün ve en uzun Hourani 27 çeşidinde 39 gün olarak bulunmuştur. Kallus oluşumu için geçen sürenin genotipe bağlı olarak değiştiği belirlenmiştir. Çeşitler arasında kallus oluşum miktarı ve yeşil bitki rejenerasyonu açısından da önemli farklılıklar gözlenmiştir. En yüksek kallus miktarı % 3.6 ile Acsad 65 çeşidinde, en düşük kallus miktarı ise % 1.5 ile Deir Alla çeşidinde görülmüştür. Hourani Nawawi, Hourani 27 ve F8 çeşitlerinde sırasıyla % 3.1, 2.3 ve 1.6 kallus oluşumu gözlenmiştir. Yeşil bitki rejenerasyon miktarı ise Acsad 65 çeşidinde % 1.78, Hourani Nawawi çeşidinde % 1.34 ve F8 çeşidinde % 0.45 olarak bulunmuştur. Hourani 27 ve Deir Alla çeşitlerinde yeşil bitki rejenerasyonu olmamıştır.

2.2. Tuz Stresi

Kavi Kishor (1988), artan NaCl stresi altında kallus kültüründe büyüme adaptasyonu gösteren pirinç türlerinin, prolin miktarının oldukça yüksek olduğunu görmüştür. Devamlı NaCl'li ortamda büyütülmüş tuza-adapte olmuş hücreler bir daha NaCl'li, prolin birikmiş ortamda büyütülmüştür. NaCl'nin (100 mol m⁻³) yeri 100 mol m⁻³ KCl ile değiştirildiğinde, tuza adapte olmuş kallusların, prolin içeriği gibi taze ve kuru ağırlıklarında, 100 mol m⁻³ NaCl'li ortamla karşılaştırıldığında düşüş göstermiştir. Bununla beraber, NaCl ve KCl eşit konsantrasyonlarda kullanıldığında (beraber eklendiklerinde), tuza adapte olmuş kalluslarda prolin birikmesini ve büyümeyi arttırmıştır. Büyüme ortamındaki Ca⁺² eksikliği, NaCl varlığında, tuza adapte olmuş hücrelerde büyümeyi inhibe etmiş fakat uyumlu olmayan hücrelerde NaCl varlığı çok az etkili olmuştur. ABA (Absisik asit) adapte olmayan kalluslarda

sadece 200 mol m⁻³ NaCl varlığında artmış fakat NaCl yokluğunda herhangi bir artma olmamıştır. Dokular, NaCl'nın sadece inhibe edici seviyeleri (500 mol m⁻³) altında ortama glisin, betain, kolin ve prolin eklendiğinde iyi büyüme göstermiş fakat sarkosin, glisin ve dimetilglisin varlığında büyüme göstermemiştir.

Gorham vd. (1990), *Triticum durum*, *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare*, *Hordeum spontaneum*, *Secale cereale* ve *Aegilops squarrosa*'nın tamamen genişlemiş genç yapraklarını hidroponik kültürde tuzlu koşullarda (NaCl + CaCl₂) büyümeye almış ve genç yapraklarındaki iyon konsantrasyonunu ölçmüşlerdir. *T. aestivum*, *S. cereale* ve *A. squarrosa* bitkileri tipik olarak yaprakta düşük Na ve yüksek K konsantrasyonu ile ayırt edilmiştir. *H. vulgare* genç yapraklardaki benzer tuz konsantrasyonu altında *T. durum*'dan daha iyi büyüme göstermiştir. Bunun farklı dokular arasındaki ya da hücrelerdeki farklı bölmeler arasındaki Na, Cl ve K'nın daha iyi dağılım göstermesinin bir sonucu olabileceği belirtilmiştir. *H. vulgare* varyetesi 'Herta' ve onun zayıf mutantının, 60 mol m⁻³ NaCl ortamında büyütüldüklerinde farklı gelişme oranı göstermiş olmalarına karşın yapraklarında benzer katyon konsantrasyonu görülmüştür. *H. vulgare* ve *T. durum* sürgünleri tek değerli katyon eksikliğinde büyütüldüğünde ve ²²Na ile işaretlenmiş 1.0 mol m⁻³ NaCl'da inkübe edildiklerinde, diğer türlere göre köklerinde daha çok ²²Na birikimi olmuştur.

Kintzios vd. (1997), kışlık buğday *Triticum aestivum* L. var. 'Vergina' tohumlarından elde ettikleri embriyoları, 0, 3, 6, 9 g/l NaCl ve büyüme regülatörlerinin çeşitli kombinasyonlarının eklendiği Murashige ve Skoog ortamına alıp kallus kültürüne başlamışlardır. Kallus oluşum oranı kullanılan her ortamda hemen hemen % 100 olmuştur. Fakat en yüksek NaCl konsantrasyonu bulunan ortamda oluşum fazı esnasında kallus büyümesinde gecikme olmuştur. Oluşum ve çoğalma fazı esnasında NaCl ve oksinin yüksek konsantrasyon uygulamasında, gövde oluşumu güçlü bir biçimde inhibe olmuştur. Ek olarak, kök ve gövde oluşumu arasındaki rekabet açıkça gözlenmiştir. Tuzlu koşullar altında köklenmede önemli ölçüde düşüş olmamıştır ve yüksek NaCl konsantrasyonları (≥ 6 g/l) özellikle kallus oluşumu için 2,4-D kullanılan tek oksin olduğunda tercih edilir. Kök oluşumu en düşük NaCl seviyesinde 6 ya da 9 g/l NaCl ile karşılaştırıldığında çok daha ince ve

uzun olmuştur. En iyi bitki rejenerasyon (eş zamanlı kök ve gövde oluşum) oranı, kallus 2 mg/l 2,4-D ortamında oluştuğunda ve 1 mg/l NAA ve 3 g/l NaCl ortamında kültüre alındığında gözlenmiştir.

Alpaslan vd. (1998), Türkiye’de yaygın olarak üretimi yapılan altı *Triticum durum* Desf. (Gerek, Bolal, Kıraç, Çakmak, Bezostaya ve Kızıltan) ve altı *Oryza sativa* L. çeşidinin (Ribe, Tri-445, Serhat 92, Kros 424, Baldo ve Rocca) tuz stresinde Ca, P, Fe, Cu, Zn ve Mn içeriklerindeki değişiklikleri araştırmışlardır. Saksıların tamamına temel gübreleme olarak azot, kireçli amonyum nitrat gübresinden 200 mg N/kg toprak düzeyinde, P ve K ise potasyum dihidrojen fosfattan 100 mg P₂O₅/kg toprak ve 125 mg K₂O/kg toprak düzeyinde uygulanmıştır. Toprakta tuz stresini yaratabilmek için 68 mmol (4g) NaCl/kg toprak uygulanmıştır. Tuzlu koşullarda yetiştirilen buğday çeşitlerinin kuru ağırlıkları %38-57 oranında, çeltik çeşitlerinin kuru ağırlıkları ise %26-61 oranında düşmüştür.

Buğday çeşitleri arasında Ca ve P içerikleri bakımından farklılıklar ortaya çıkmıştır. Gerek, Bolal, Kıraç, Çakmak ve Bezostaya çeşitlerinin tuz stresinde P içerikleri önemli oranda etkilenmez iken Kızıltan çeşidinin P içeriği önemli oranda düşmüştür. Ca içerikleri incelendiğinde, tuz uygulaması ile bütün çeşitlerin Ca içeriği önemli miktarlarda artış göstermiştir. Kıraç, Çakmak ve Kızıltan çeşitlerinin Ca içerikleri tuzlu koşullarda diğerlerine göre daha yüksek olmuştur. Tuz stresinde Gerek, Bolal ve Kıraç çeşitlerinin demir içerikleri önemli oranda düşmüş, Kızıltan çeşidinin değişmemiş, Çakmak ve Bezostaya çeşitlerinin demir içerikleri ise tuz stresinde artmıştır. Gerek ve Kızıltan çeşitlerinin Zn içerikleri tuz stresinde azalırken diğer çeşitlerin ise Zn içerikleri artmıştır. Tuzluluk çeltik çeşitlerinden Tri-445 ve Kros 424’ün P içeriğinde artışa sebep olmuştur. Fe içeriği ise Tri-445 ve Rocca’da tuzlulukla azalmış, Çakmak, Bezostaya, Ribe, Serhat 92, Kros 424 ve Baldo çeşitlerinde artmıştır.

Almansouri vd. (1999), durum buğdayının çimlenmesi üzerine tuz stresinin osmotik etkisi yerine iyonik toksisitesinin önemini araştırmışlardır. Tuz ve kuraklık dirençleri farklı 3 *Triticum durum* Desf. çeşidi (Omrabi-5, kuraklığa dirençli; Belikh, tuza

toleranslı; Cando, tuza duyarlı) tohumlarını NaCl'nın çeşitli iso-osmotik solüsyonlarında, mannitol ve polyetilen-glikol (PEG)'de (osmotik potansiyel 0.15 (kontrol solüsyonu)-0.58, -1.05 ya da -1.57 Mpa) inkübe etmişlerdir. Ölçülü stres yoğunluğu çimlenmeyi sadece geciktirmiş fakat NaCl ve PEG'in yüksek konsantrasyonları final çimlenme oranını düşürmüştür. PEG final çimlenme oranına en zararlı madde iken mannitol böyle bir etki göstermemiştir. Endospermdeki nişasta ve eriyebilir şeker içeriği, amilaz aktivitesi gibi azalmıştır. NaCl ve PEG'in zararlı etkisi en çok LS ortamında çimlenen izole embriyolarda görülmüştür. Bununla beraber, NaCl'ya maruz bırakılan embriyolarda düşük oranda iyileşme ve bazı anormal çimlenme olayları gözlenirken, PEG'e maruz bırakılan bütün embriyolarda stresten kurtulduktan sonra iyileşme gözlenmiştir. PEG'in ana etkisinin su alınımlı inhibisyonu yoluyla ortaya çıkabileceği, NaCl'nın zararlı etkisinin ise toksik iyonların birikiminin uzun süreli etkisine bağlı olabileceği sonucuna varmışlardır.

Arzani ve Mirodjagh (1999), 28 durum buğdayı (*Triticum turgidum* var. Durum) çeşidinin olgunlaşmamış embriyo kültürü, kallus üretimi ve *in vitro* tuz toleransına cevabını araştırmışlardır. Çeşitlerin tuza toleransını değerlendirmek için, büyüyen kalluslar her 4 haftada bir NaCl'nın farklı konsantrasyonlarının bulunduğu (% 0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5, 1.8 ve 2.1 w/v) kültür ortamlarına alınmıştır. Çeşitlerin olgunlaşmamış embriyolardan kallus oluşum oranlarını karşılaştırmak için, kallus oluşum sıklığı ile kallusun taze ağırlığı temel alınmıştır. Tuz toleransı için, nispi taze ağırlık miktarı ve kallusun nekrozis yüzdesi kullanılmıştır. Çeşitler arasında, olgunlaşmamış embriyolardan regenerasyon potansiyeli oranında önemli farklılıklar bulunmuştur. Nispi taze ağırlık miktarı, değerlendirme yapmak için, çeşitlerde kallus oluşum sıklığından daha önemli bulunmuştur. Nispi taze ağırlık oranı Mexical-75 ve Omrabi-5 çeşitlerinde 1.23'ten 14.65 g'a yükselmiştir. PI 40 100 ve Dipper-6 çeşitlerinden elde edilen kallusların, *in vitro* koşullar altında tuza toleransta diğer çeşitlerle karşılaştırıldığında üstünlük gösterdiği bulunmuştur.

Meneguzzo vd. (1999), kuraklığa ve ağır metallere duyarlılığı farklı olan 2 *Triticum durum* Desf. (Ofanto ve Adamello) çeşidi sürgünlerine, NaCl'nın etkisini araştırmışlardır. Sürgünler 9 gün Hogland's 2 solüsyonunda, NaCl konsantrasyonu

arttırılarak (0.50 ve 100 mmol/L) büyütülmüştür. Kontrol grubunu ve tuz-stresine maruz bırakılan bitkilerin askorbat ve glutathione içerikleri, redüksiyon safhaları ve askorbat peroksidaz, monodehidroaskorbat reduktaz, dehidroaskorbat reduktaz aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Sonuçlar NaCl'nin hücrel zehirliliğinin mekanizmasını ve türlerdeki antioksidant savunmanın oluşumundaki anlamlı farklılığı göstermiştir. NaCl'nin yüksek miktarı her iki türde de köklerde glutathione içeriğini arttırmıştır. Bu muhtemelen ilk streste, organlarda artan antioksidant ihtiyacını karşılamak içindir. Ofanto çeşidinin köklerinde glutathione oksidasyonu gözlenmiştir. Antioksidatif enzim aktivitesi genelde gövdede artmış ve köklerde azalmıştır. Adamello çeşidinin Ofanto çeşidi ile karşılaştırıldığında NaCl stresinden daha çok etkilendiği bulunmuştur.

Essa (2002), soya fasulyesinin tuza duyarlılığını; tuzluluğun, tohum çimlenmesine, gövde ve köklerin kuru ağırlıklarına ve yaprakların mineral içeriklerine etkisini belirleyerek açıklamıştır. Üç soya fasulyesi çeşidi, Lee, Coquitt ve Clark 63 farklı tuz seviyesi bulunan topraklarda yetiştirilmiştir. Araştırmacı arzu edilen tuzluluk seviyelerini elde etmek için toprak örneklerini 15 dS m^{-1} elektrik iletkenliğine maruz bırakmıştır. Çimlenme yüzdeleri ekimden 10 gün sonra, gövde ve köklerin kuru ağırlıkları 45 gün sonra ölçülmüştür ve Na^+ , K^+ , Ca^+ , Mg^{2+} ve Cl^- miktarları belirlenmiştir. Çimlenme yüzdesi tuz seviyesinin yükselmesiyle önemli derecede düşüş göstermiştir. Lee çeşidi tuz stresinde, Coquitt ve Clark 63 çeşidinden daha az etkilenmiştir. Her üç çeşit içinde 8.5 dS m^{-1} bitki uzunluğunda düşüğe yol açmıştır. Bununla beraber Lee çeşidi diğer iki çeşitten daha uzun boylu olmuştur. Tuz stresi bütün çeşitlerinde, yapraklarda aşırı miktarda Na^+ ve Cl^- birikimine neden olmuştur. Ayrıca daha yüksek tuz seviyelerinde, Lee çeşidi, Coquitt ve Clark 63 ile karşılaştırıldığında, daha düşük Na^+ ve Cl^- konsantrasyonuna, daha yüksek K^+ ve K^+/Na^+ oranına sahip olmuştur. Tuz stresi, çalışılan çeşitlerin yapraklarında K^+ , Ca^{2+} ve Mg^{2+} birikimini azaltmıştır. Bu çalışmada Lee'nin en toleranslı çeşit olduğu ve çeşitlerin tuz toleransı ile yapraklardaki makroelement birikimi arasında bir ilişki olduğu bulunmuştur. Clark 63 çeşidi diğer iki çeşide göre tuz stresinden daha çok etkilenmiştir. Büyüme ve bitki boyu, tuz seviyesinin artışıyla olumsuz etkilenmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Yapılan çalışmalarda, *Triticum durum* Desf.'un Kunduru 1149 ve Berkmen 469 ve doubled haploid Berkmen makarnalık buğday çeşitleri kullanılmıştır. Orta Anadolu'da tarımı yapılan bu iki buğday çeşidinin kromozom sayısı $2n=4x=28$ 'dir. Kunduru 1149, Eskişehir Tarımsal Araştırma Merkezi'nden, Berkmen 469 ise Ankara Tarımsal Araştırma Merkezi'nden seleksiyon yolu ile ıslah edilen eski çeşitlerimizdendir. Çeşit tohumları Ankara Tarım ve Köy İşleri Araştırma Enstitüsünden temin edilmiştir. Doubled haploid buğday tohumları ise buğdayın mısır ile tozlanarak haploid embriyo kurtarma tekniği ile elde edilmişlerdir (Savaşkan vd., 1997).

3.2. Yöntem

3.2.1. Donör (Verici) Bitkilerin Yetiştirilmesi ve Toplanması

Bir kısım kum ve 3 kısım turba toprak karışımı saksılara konularak yüzey düzleştirildi. Kunduru, Berkmen ve DH-Berkmen çeşitlerine ait tohumlar her saksıya 3 adet olacak şekilde ekildi. Tohumların ekiminden itibaren bitkiler, 16 saat/gündüz 8 saat/gece fotoperiyodu düzeninde, 18-20 C° sıcaklık altında yetiştirildi (Şekil 3.1. a). Tohumların ekiminden 20 gün sonra, sulama öncesi suni gübre verildi ve 15 günde bir verilmeye devam edildi. Ayrıca hastalıklara karşı ilaçlama yapıldı. Henüz olgunlaşmamış ve içerisinde birinci polen mitozu aşamasına gelmiş tek çekirdekli mikrosporları bulunduran anterler, anter kültürü için uygun başlangıç materyalidir. Başaklar, bu durum esas alınarak toplandı (Şekil 3.1. b,c).



(a)



(b)



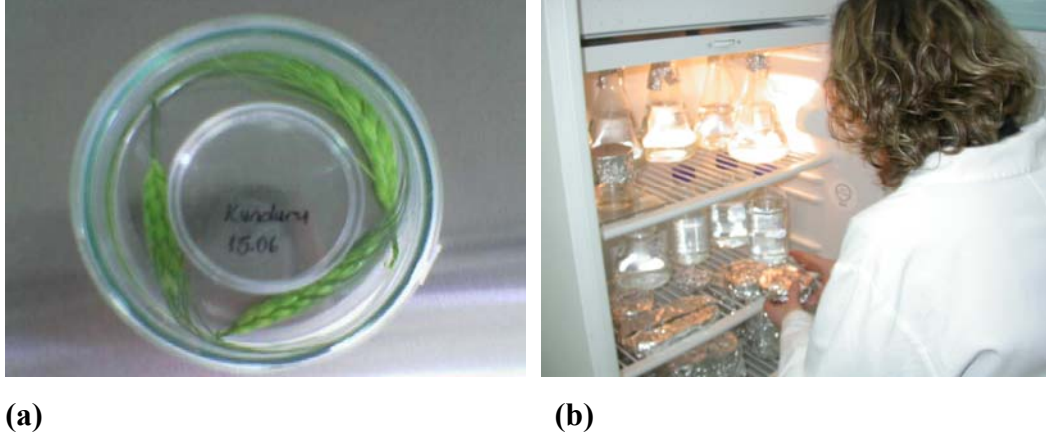
(c)

Şekil 3.1. Donör bitkilerin yetiştirilmesi ve toplanması (a) Donör buğday bitkileri, (b) Yaprak kınından henüz çıkmamış, anter kültürü için uygun başak, (c) Kılçıkları kesilmiş, soğuk önışleme alınmaya hazır başak

3.2.2. Soğuk Önışlem

Kundur, Berkmen ve DH-Berkmen çeşitlerinin başakları, 28 gün, 15 gün ve 7 gün +4°C'de soğuk önışleme alındı. Başakların steril hava kabinetlerinde (laminar flow bench) %70'lik alkol ile yüzey sterilizasyonları yapıldı ve 3 kez saf su ile durulandı. Steril koşullarda kın yapraklarının içinden çıkarılan ve kılçıkları kesilen başaklar, içinde bir miktar steril dH₂O bulunan 3 cm'lik petri kutuları ile beraber 9 cm'lik petri kutuları içerisine yerleştirildi (Şekil 3.2. a). Petri kutularının kenarları parafilm ile kapatıldı, alüminyum folyo ile sarıldı ve üzerlerine çeşit, başak sayısı ve günün tarihi

yazıldı (Şekil 3.2. b). Bu şekilde +4°C’ de saklanan başaklar soğuk önişlem süreleri tamamlandıktan sonra çıkarılarak kültür ortamına konulmak üzere steril ortama alındı.



Şekil 3.2. Soğuk önişlem uygulaması (a) Soğuk önişleme alınmak üzere hazırlanmış başaklar, (b) Aluminyum folyo ile sarılmış +4°C buzdolabına alınan başaklar

3.2.3. Kültür Ortamlarının Yapılışı

Kültür için Marsolais ve Kahsa (1985) tarafından geliştirilen BAC1 ortamı ve Murashige ve Skoog (1962) tarafından geliştirilen MS ortamı kullanıldı (Çizelge 3.1). BAC1 ve MS kültür ortamında kullanılan bileşenler hassas terazide ölçülerek ağırlık/hacim (w/v) esasına göre hazırlandı ve (Şekil 3.3. a). BAC1 kültür ortamı her defasında 100 ml hazırlandı. Önce 50 ml dH₂O’da eritilen ficoll 120°C’ de 20 dakika otoklavda sterilize edildi. Bunun için ficoll bir erlen mayer kabına konuldu ve kabın ağzı pamuk ve aluminyum folyo ile kapatılarak mikrodalga fırına konuldu. Diğer 50 ml’ lik dH₂O’da ise makrotuzlar, mikrotuzlar, vitaminler, organik asitler, şekerler ve diğer komponentler, BAC1 ortamı içeriğine uygun miktarlarda alınarak, ficoll’ den ayrı olarak eritildi ve otoklavlanarak sterilize edildi. Ayrıca denemede kullanılan NAA ve BAP büyüme regülatörleri milipor sterifilde (0.22 µm) filtre edildikten sonra kültür ortamına ilave edildi (Şekil 3.3. b). MS ortamı ise üç ayrı şekilde hazırlandı. MS içeriği her üç ortamda da kullanıldı. 1. ortama 0.5 mMol NaCl, 2.

ortama 1.0 mMol NaCl ve 3. ortama 1.5 mMol NaCl eklenerek farklı konsantrasyonlarda, amaca uygun NaCl'lı kültür ortamları oluşturuldu.

Çizelge 3.1. BAC1 başlangıç ve MS rejenerasyon ortamı bileşenleri

Bileşenler	BAC1 mg/l	MS Rejenerasyon Ortamı mg/l
Makrotuzlar		
<u>Solüsyon A</u>		
1. NH ₄ NO ₃	200	1650
2. (NH ₄) ₂ SO ₄	400	-
<u>Solüsyon B</u>		
1. KH ₂ PO ₄	170	170
2. NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	150	-
3. CaCl ₂ x 2 H ₂ O	600	440
4. MgSO ₄ x 7 H ₂ O	300	370
<u>Solüsyon C</u>		
1. KNO ₃	1500	1900
Mikrotuzlar		
1. KI	0.8	0.830
2. MnSO ₄ x H ₂ O	5.0	22.30
3. Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0.250	0.250
4. CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0.025	0.025
5. H ₃ BO ₃	5.0	6.200
6. ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	2.0	8.600
7. CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0.025	0.025
Demir Kaynağı		
1. FeSO ₄ x 7 H ₂ O	27.8	27.8
2. Na ₂ EDTA	37.3	37.3
Vitaminler		
1. Pyridoxine- HCl	0.5	0.5
2. Ascorbic acid	1.0	-
3. Nicotinic acid	0.5	0.5
4. Thiamine- HCl	1.0	0.1
Aminoasitler		
1. Glisin	-	2
2. Glutamin	-	146
Organik Asit		
1. Citric acid	10.0	-
Organik Maddeler		
1. Casein hydrolysat	300	-
Myo- inositol	2000	100.0
Karbon Kaynağı		
1. Sükröz	90 g/l	30 g/l
Büyüme Regülatörleri		
1. NAA	0.5	1.0
2. BAP	1.0	1.0
Ajanlar		
1. Ficoll 400	100	-
2. Bacto-agar	-	7 g/l
pH	6.2	5.8
Sterilizasyon	otoklav	otoklav



(a)



(b)

Şekil 3.3. Kültür ortamlarının hazırlanması (a) Kültür ortamı bileşenlerinin ölçülmesi, (b) Ficoll, mikro- ve makrotuzlar ve milipor sterifil

3.2.4. Steril Ortamda Yapılan İşlemler

Anterler kültür ortamına konulmadan önce her başağın ortasından bir anter alındı ve içerisinde bulunan mikrosporların gelişme devresi bir damla %2'lik asetokarmin boyası ile ışık mikroskobu altında kontrol edildi (Şekil 3.4. a). Tek çekirdekli veya polen mitozuna yakın olan mikrosporları bulunduran anterler kullanıldı 3 cm'lik petri kutularına 3 ml olacak şekilde konulan BAC1 ortamına (Şekil 3.4. b) anterler, steril ortamda stereo mikroskop kullanılarak, iki steril pinset ile alınarak yerleştirildi (Şekil 3.4. c). 1 ml kültür ortamı için 10-20 anter olmak üzere her petri kabına 30-60 anter konuldu (Şekil 3.4. d,e). 3 cm'lik petri kaplarının kenarları parafilm ile sarılarak alüminyum folyo ile kaplandı.

Kültürlerin inkübasyonu 28°C' de, ışısız ortamda yapıldı. İnkübasyon işleminden sonra, kallus üreten ve üretmeyen anterler ve oluşan kallus sayısı her çeşit için ayrı ayrı sayılarak kaydedildi.

Yenileme işlemi; kültür başlangıcının 2. ve 4. haftalarında yine steril ortamda, her petri kabı için ayrı bir mikropipet ucu kullanılarak yapıldı. Bunun için her ilk kültür petrisinden 1 ml alınarak yerine 1 ml taze kültür ilave edildi ve yenileme işlemi tamamlandı (Şekil 3.4. f).



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)



(f)



(g)



(h)

Şekil 3.4. Steril ortamda yapılan işlemler. (a) Tek çekirdekli mikrospor, (b) Sıvı kültür ortamının 3 cm'lik petri kutularına konması, (c,d) Başaklardan anterlerin alınması, (e,f,g) Anterlerin kültür ortamına konması, (h) Yenileme işlemi

3.2.5. Rejenerasyon İşlemi

İnkübasyon işlemi sonunda oluşan kalluslar MS kontrol ve 0.5 mMol, 1.0 mMol ve 1.5 mMol NaCl içeren modifiye edilmiş MS ortamlarına alındı. Kalluslar bu ortamlarda 25 °C sıcaklıkta 16 saat gündüz fotoperiyodunda rejenerant bitki oluşumu için bekletildiler.

Tüm işlemleri aşağıdaki gibi özetlemek mümkündür (Çizelge 3.2)

Çizelge 3.2. Anter kültürü çalışmasında birbirini izleyen işlemler dizini

Donör bitki yetiştirilmesi	60-75 gün			16/8 saat gece/gündüz 18-20 °C
Soğuklama	7 gün	15 gün	28 gün	+4 °C buzdolabı
İnokülasyon	Anterler			BAC1 ortamı
Inkübasyon	Kalluslar			Karanlıkta 28 °C
Bitki rejenerasyonu				MS ortamı 25°C 16/8saat gece/gündüz

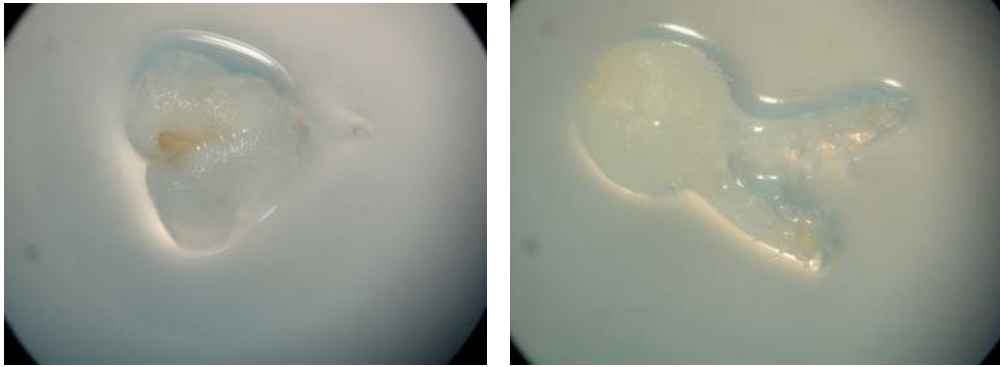
3.2.6. Sonuçların Değerlendirmesi

Her uygulamaya göre, kültür ortamına koyulan anter sayılarak kaydedildi. Meydana gelen kallus miktarı sayılmış, elde edilen kallusun anter sayısına oranı ile % değer bulundu. Bu değer her 100 anterden meydana gelen kallus miktarıdır. Meydana gelen kallus miktarı düşük olduğundan bir deneme desenine göre istatistik analiz yapılamadı.

4. BULGULAR

Kunduru 1149, Berkmen 469 ve DH Berkmen çeşitlerinden toplam 180 başak toplanmış ve soğuk önışlem uygulamasının etkisini araştırmak için başaklar 7, 15 ve 28 gün süre ile +4°C sıcaklıkta tutulmuştur. Ön işleme alınmış başaklardan alınan toplam 2680 anter BAC1 ortamına alınmıştır. Kültür ortamındaki anterler inkübatörlerde uygun fiziksel koşullarda 25 °C sıcaklık ve karanlıkta kallus oluşumuna kadar bekletilmiştir. Kallus oluşum süresi en uzun DH-Berkmen genotipinde 35 gün olarak tespit edilmiştir. Bu süre en kısa Berkmen 469 çeşidinde 20 gün ve Kunduru 1149 çeşidinde 28 gün olarak tespit edilmiştir. Kallus oluşumu için geçen sürenin de genotipe bağlı olduğu düşünülmektedir.

Kunduru 1149 çeşidinde, kültüre alınan 850 anterden % 0.58, Berkmen 469 çeşidinde kültüre alınan 1115 anterden % 0.62 ve DH Berkmen çeşidinde ise kültüre alınan 715 anterden % 0.27 kallus üretimi gözlenmiştir (Şekil 4.1. a,b). Berkmen 469 çeşidi % 0.62 ile en yüksek kallus oluşturan çeşit olmuştur (Çizelge 4.1).



(a)

(b)

Şekil 3.5. Kunduru 1149 ve Berkmen 469 genotiplerinden elde edilen kalluslar

Çizelge 4.1. Genotiplerin anter kültürüne cevabı

Çeşit	Toplanan başak sayısı	Önişleme giren başak sayısı			Anter sayısı (n)	Kallus sayısı (n)	Kallus/Anter (%)	Kallus oluşumu için geçen süre
		28 gün	15 gün	7 gün				
Kunduru 1149	60	35	10	10	850	5	0.58	28 gün
Berkmen 469	75	40	10	15	1115	7	0.62	20 gün
DH Berkmen	45	30	5	5	715	2	0.27	35 gün
Toplam	180	105	25	30	2680	14	0.52	

4.1. Soğuk Ön İşlemin Çeşitler Üzerindeki Etkisi

En başarılı soğuk önişlem uygulaması % 1.97 kallus oluşumu ile 15 gün olarak bulunmuştur. Bunu % 0.62 kallus oluşumu ile 7 günlük soğuk ön işlem ve % 0.16 ile 28 günlük soğuk ön işlem uygulaması izlemektedir.

Çizelge 4.2. Farklı ön işlem uygulamalarının kallus oluşumuna etkisi

Ön işlem süresi (gün)	Anter sayısı (n)	Kallus sayısı (n)	Kallus/anter %
7	480	3	0.62
15	405	8	1.97
28	1795	3	0.16
Toplam	2680	14	0.52

4.1.1. Soğuk Ön İşlemin Kunduru 1149 Çeşidine Etkisi

Kunduru 1149 çeşidinde, +4 °C'de 15 gün soğuk ön işleme maruz tutulan ve BAC1 kültür ortamına transfer edilen anterlerin % 1.81 kallus üretimi ile en iyi verime sahip olduğu görülmüştür. Bu oran 7 günlük soğuk ön işlemden % 1.42 iken, en düşük 28 günlük soğuk ön işlemden % 0.16 olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.3. Kunduru 1149 çeşidinin farklı ön işlem uygulamalarında anter kültürüne cevabı

Kunduru 1149	Alınan anter sayısı (n)	Kallus sayısı (n)	Kallus/ anter (%)	Bitki rejenerasyonu (n)
7 gün ön işlem	140	2	1.42	-
15 gün ön işlem	110	2	1.81	-
28 gün ön işlem	600	1	0.16	-
Toplam	850	5	0.58	-

4.1.2. Soğuk Ön İşlemin Berkmen 469 Çeşidine Etkisi

Berkmen 469 çeşidinde, +4 °C'de 15 gün soğuk ön işleme maruz tutulan ve BAC1 kültür ortamına transfer edilen anterlerin % 2.08 ile en iyi sonucu verdikleri gözlenmiştir. Bu oran 7 günlük soğuk ön işlemden % 0.72 iken 28 günlük ön işlemden % 0.16 olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.4. Berkmen 469 çeşidinin farklı ön işlem uygulamalarında anter kültürüne cevabı

Berkmen 469	Alınan anter sayısı (n)	Kallus sayısı (n)	Kallus/ anter (%)	Bitki rejenerasyonu (n)
7 gün önişlem	275	1	0.72	-
15 gün önişlem	240	5	2.08	-
28 gün önişlem	600	1	0.16	-
Toplam	1115	7	0.62	-

4.1.3. Soğuk Ön İşlemin DH Berkmen Çeşidine Etkisi

DH Berkmen çeşidinde +4 °C’de 15 gün soğuk ön işleme maruz tutulan ve BAC1 kültür ortamına transfer edilen anterlerin % 1.81 ile en iyi sonucu verdikleri gözlenmiştir. Bu oran 28 günlük soğuk ön işlemden % 0.16 iken 7 günlük ön işlemden kallus oluşumu görülmemiştir.

Çizelge 4.5. DH Berkmen çeşidinin farklı ön işlem uygulamalarında anter kültürüne cevabı

DH Berkmen	Alınan anter sayısı (n)	Kallus sayısı (n)	Kallus/ anter (%)	Bitki rejenerasyonu (n)
7 gün önişlem	65	-	-	-
15 gün önişlem	55	1	1.81	-
28 gün önişlem	595	1	0.16	-
Toplam	715	2	0.27	-

4.2. Haploid Bitki Rejenerasyonu

Başlangıç ortamında (BAC1) elde ettiğimiz ve MS rejenerasyon ortamına (MS-kontrol, MS-0.5 mMol NaCl, MS-1.0 mMol NaCl ve MS-1.5 mMol NaCl) transfer ettiğimiz kalluslardan rejenerant bitki elde edilememiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Anter kültür tekniği yeni genotip oluşturmada ve haploid bitki üretiminde buğday ıslah programlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Durum buğdayında anter kültürünü etkileyen faktörlerin tanımlanması, *in vitro* tekniklerin kullanımını arttırmıştır. Anter kültüründen haploid bitki üretimi en az üç farklı özellik tarafından kontrol edilir. Bunlar; embriyo oluşumu, bitki rejenerasyonu ve yeşil bitki rejenerasyon sıklığıdır (Lazar vd., 1984; Deaton vd., 1987; Szakacs vd., 1988). Bu çalışmada durum buğdayının 3 farklı genotipinin anter kültürüne kabiliyeti farklı önişlem koşulları uygulayarak araştırılmıştır.

Anter kültüründe başarı, çok büyük bir oranda anterlerin alındığı bitkilerin genotipine bağlıdır (Tomes,1990; Razdan, 1992; Saidi vd., 1997). Han (1986) buğday bitkisinde, polen kallusunun oluşum miktarının ve bitki rejenerasyonunun genotipe bağlı olduğunu belirtmiştir (Hassawi vd., 2005). Haploid bitki vermesi istenen genotipten yüksek düzeyde androgenetik yanıt alabilmek için başvurulacak iki yol bulunmaktadır. Bunlardan birincisi, Dunwell (1981)'inde önerdiği gibi, her genotip için kültür koşullarını optimize etmektir. İkinci seçenek ise anter kültüründe embriyo oluşturma başarısı yüksek genotiplerle embriyo oluşturma başarısı düşük genotipleri melezleyerek, melez döllerden embriyo elde etmeyi sağlamaktır. Bullock vd. (1982)'de buğdayda anter kültürü yoluyla embriyo oluşturma yeteneği bulunmayan bir seri çeşit ile iyi bir rejenerasyon kapasitesine sahip olan 'Centurk' çeşidi ile melezledikten sonra; bu olumlu özelliğin F₁ döllerine aktarılabilirdiğini görmüşlerdir. Resiprokal melezlemelerden alınan sonuçlar da, kültüre alınan anterlerin embriyo oluşturma özelliğinin, sitoplazmik etkilerin kontrolü altında olduğunu göstermiştir (Bullock vd., 1982).

Bregitzer (1992) ve Daalloul (1992) anter kültürü metoduyla kallus oluşum oranında *Triticum turgidum* ve *Triticum aestivum* arasında önemli farklılıklar bulmuşlardır. *T. aestivum*'da bu oran % 69.36 olmasına karşın *T. turgidum*'da % 34.33'tür. Ayrıca ekmeklik ve makarnalık buğdayların farklı genotipleri içinde de farklılık gözlenmiştir. Diğer çalışmalarda anter kültüründen elde edilen kallus oranı % 19'u

geçememiştir (Piri,1991) ve arpa ve buğday için olgunlaşmamış embriyolardan elde edilen kallus sıklığı % 44'ün üzerine çıkamamıştır (Sears ve Deckard, 1982). Bu sonuçlar rejenerasyonun buğdayda genotipik kontrol altında olduğunu gösterir (Rines ve McCoy, 1981; Sears ve Deckard, 1982). Bizde çalışmamızda *Triticum durum* Desf. türünün 'Kundur 1149', 'Berkmen 469' ve 'DH-Berkmen' genotiplerinin anter kültürüne kabiliyetlerini araştırdık. En iyi kallus oluşumu % 0.62 ile Berkmen 469 genotipinde bulundu.

Savaşkan vd. (1997), arpa anter kültüründe kallus üretimi için geçen sürenin 25-60 gün arasında değiştiğini ve kallusların % 93'nün ilk 30 gün içinde oluştuğunu belirtmişlerdir. Yaptığımız çalışmada buna benzer olarak kallus oluşum süresi en uzun DH- Berkmen genotipinde 35 gün olarak tespit edildi. Bu süre en kısa Berkmen 469 çeşidinde 20 gün ve Kunder 1149 çeşidinde 28 gün olarak tespit edildi. Franzone vd. (1984) ise çeşitli arpa çeşitlerinin % 85'inin kültürün ilk 70 gününde kallus oluşturduğunu açıklamışlardır (Savaşkan vd., 1999).

Donör bitkinin genotipi son derece elverişli olsa bile, mikrosporlardan *in vitro* koşullarda haploid embriyo uyarımını başlatabilmek, bu bitkilerin yetiştirildiği koşullara da bağlıdır. Buğday, arpa, çeltik ve çavdar gibi bitkilerde, donör bitkinin yetiştirme koşullarının anter kültüründeki başarı üzerinde çok etkili olduğu bilinmektedir. Foroughi-Wehr ve Wenzel (1993) yaptıkları çalışmada, uygun yetiştirme koşulları sağlanmadığında, anter kültüründeki başarısı yüksek olan 'Iğri' buğday çeşidinin bile sadece albino embriyolar oluşturmuş ve tek bir yeşil normal haploid bitki elde edememişlerdir. Çalışmamızda kullandığımız donör bitkiler, bitki yetiştirme odasında, 18°C sıcaklık ve 16/8 gün/gece fotoperiyodunda yetiştirildi.

In vitro androgenesisin başarıyla uyarılmasında etkili olan en önemli faktörlerden birisi, anterlerin donör bitkiden izole edildiği anda mikrosporların içinde buldukları gelişme dönemidir. Çoğu bitki türünün anter kültürlerinde en iyi sonuçlar, tek çekirdekli mikrospor döneminin erken veya geç aşamasındaki mikrosporları içeren anterlerden alınmaktadır (Datta ve Wenzel, 1987; Jähne ve

Lörz, 1995). Mikrosporlar içerisinde nişasta depolanmaya başladıktan sonra, gelişmeyi sporofitik yöne kaydırmak ve haploid embriyo elde etmek için yapılacak uyarılar etkili olmamaktadır. Bu çalışmada da, anterler kültür ortamına alınmadan önce %2'lik asetokarmin boyası ile boyanarak kontrol edildi ve tek çekirdeki yapıya sahip uygun mikrosporları bulunduran anterler kullanıldı.

Çiçek tomurcuklarına yapılan bazı ön uygulamalar, mikrosporların kültür sırasındaki gelişmesi üzerinde olumlu etki yapmaktadır. Buğday anter kültüründe en etkili ön uygulama, tomurcuklara yapılan soğuk şoklarıdır. 4-10 °C' ler arasında 72 saat ile 4 haftaya kadar tutulan tomurcuklar, polen rejenerasyonu bakımından olumlu yanıtlar vermiştir (arpa: Sunderland vd., 1981; buğday: Lazar vd., 1985). Düşük sıcaklıklarda; birinci polen mitozu aşamasında tutulan mikrospor sayısında artış olmakta ve nişasta üretimi bloke edilmektedir. Bilindiği gibi nişasta içeriği düşük tek çekirdekli mikrosporlar, kültür koşullarında embriyo oluşturmak üzere sporofitik gelişmeye doğru daha kolay yönlendirilebilmektedir (Foroughi-Wehr ve Wenzel, 1993). Yani stres önışlemi, anterlerin gametofitik yerine sporofitik yönde gelişimini sağlamaktadır (Touraeu vd., 1997; Reynolds, 1997; Hu ve Kahsa, 1999).

Sunderland ve Roberts (1979), soğuk şoku uygulamasında sıcaklık derecesi ve sürenin önemli olduğunu vurgulamış; çok soğuk olmayan +7 ile +15°C gibi sıcaklıklarda uzun süre (7-14 gün) yapılan şoklamanın, daha düşük derecelerde kısa süre yapılan uygulamalardan daha etkili olduğunu ileri sürmüştür. Huang ve Sunderland (1981) arpada +4°C'de 28 günlük soğuk önışlemin oldukça kullanışlı olduğunu ileri sürmüşlerdir. Yani stresin sıcak ya da soğuk oluşuda genotipe bağlıdır. Sıcaklık şokunun da birçok türde androjenetik cevabı iyileştirdiği belirtilmiştir (Xie vd., 1997; Kiviharju ve Pehu,1998). Bizde yaptığımız çalışmada her genotipten aldığımız başakları ayrı ayrı 28, 15 ve 7 gün + 4°C'de soğuk önışleme maruz bıraktık. En iyi sonuçlar her üç genotiptede 15 gün soğuk önışleme giren başaklardan alınan anterlerden alındı (Çizelge 4.2.).

Soğuk uygulamaları ile anterlerde bulunan absisik asit miktarının azaltıldığını bildiren Johansson ve Eriksson (1977), tomurcuklara soğuk uygulayarak engelleyici

bir hormon olan absisik asidin bu olumsuz etkisinin ortadan kaldırılabileceğini ileri sürmektedir. Ellialtıoğlu ve Tıprıdamaz (2002) ve Özkum vd.(2000), anterlerde bulunan ve embriyo oluşumunu engelleyebileceği ileri sürülen absisik asidin soğuk uygulamaları ile etkisini azaltmayı amaçlayarak yaptıkları çalışmada, gerçekten de soğuk uygulamalarının anterlerdeki absisik asit miktarını azaltıcı etki yaptığını ortaya koymuşlardır.

Anter kültüründe başarıyı etkileyen bir diğer noktada anterlere mannitol önışlemi uygulanmasıdır. Anterlerin önce 0.3 M mannitol içeren ortamda 4 gün tutulması ve sonra kültür ortamına transferi mikrospor bölünmesini ve yeşil bitki rejenerasyonunu destekleyici etki yapmıştır (Roberts-Oehlschlager ve Dunwell, 1990; Hoekstra vd., 1996). Bununla beraber Hou vd. (1993)'ya göre taze anterlerin 3 gün mannitol solüsyonunda önışleme tabi tutulması, başakların 28 gün soğuk önışleme tabi tutulmasından, yeşil bitki üretimi bakımından daha az etkilidir. Cistue vd. (1994) 'İgri' çeşidi ile yaptıkları çalışmada, 0.7 M mannitolden daha yüksek konsantrasyonlarda (1-1.5 M) tutulan anterlerde, mannitolün ne bölünen mikrospor sayısını, embriyoları ne de yeşil bitki oranını attırmadığını ileri sürmüşlerdir.

Bitki türlerinin çoğuna cevap verebilecek bir anter kültürü ortamı bulmak kolay değildir. Anter yanıtının aynı türdeki farklı genotipler arasında bile farklılık gösterdiği bir olayda, ortak besin ortamı önermek olası görünmemektedir. Besin ortamı sadece mikrosporların beslenmesini sağlamakla kalmaz aynı zamanda direk embriyo gelişimini de sağlar. Ortam içeriğinde modifikasyonlar yapılırken pH ve mikro- ve makroelementleri dengede tutmak önemlidir. Ortamın ve özellikle sıvı ortamın pH'ı, embriyo gelişimi açısından oldukça önemlidir (Datta, 2005). Doğramacı-Altuntepe vd. (2001), durum buğdayının 10 çeşidinin anter kültürüne cevabını modifiye edilmiş 4 başlangıç kültür ortamı [BAC1 (Marsolais ve Kahsa, 1985), BAD1, BAD3 (Trottier vd., 1993), M-42)] kullanarak araştırmışlar ve en iyi ortamı BAD1 ve BAC1 olarak bulmuşlardır. Ximing vd. (1994) ise 10 arpa genotipinin anter kültürüne cevabını FHG ve BAC3 ortamlarını karşılaştırmak suretiyle araştırmışlardır. BAC3 ortamının her 10 genotipte daha başarılı sonuç verdiğini ortaya koymuşlardır. Günümüzde her türde ve hatta çeşit bazında önerilen

sayısız besin ortamı kompozisyonu bulunmaktadır. Temel besin ortamı olarak, anter kültüründe en fazla Murashige ve Skoog, White ve Nitsch kullanılmaktadır (Sink ve Padmanabhan, 1977). Çalışmamızda başlangıç kültür ortamı olarak BAC1 (Marsolais ve Kahsa, 1985) ve rejenerasyon ortamı olarak MS (Murashige ve Skoog, 1962) ortamı kullanıldı (Çizelge 3.1.).

Şekerin besin ortamlarında osmotik basıncı ayarlayıcı bir etkisinin bulunması (Reinert ve ve Bajaj, 1977), bunun yanında yüksek düzeydeki şekerin, enerji kaynağı olarak solunumu ve metabolik aktiviteyi arttırarak hücre bölünmesi ve embriyoid oluşumunu arttırması, yüksek şeker içeriğinin anter kültüründe diploid hücrelerin bölünmesini engellerken haploid hücrelerin bölünmesini teşvik etmesi, anter kültüründe yüksek dozda şeker kullanımının gerekçeleri olarak görülmektedir (Babaoğlu vd., 2002).

Karbon kaynağı olarak buğday anter kültürlerinde büyük bir çoğunlukla sükroz kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra maltoz, glukoz, glukoz ve sükroz karışımı gibi uygulamalarda bulunmaktadır. Lashermes vd. (1991) kültür ortamında sükroz yerine maltoz kullanımının, *Triticum aestivum* türünde, anter kültüründeki başarıyı genotipe bağlı olarak değiştirdiğini ileri sürmüşlerdir. Çalışmamızda BAC1 başlangıç ortamında sükroz 90 g/l, MS rejenerasyon ortamında ise 30 g/l olarak kullanılmıştır.

Kültür ortamındaki nitrojen içeriği androgenesiste önemli bir rol oynar (Raina ve Zapata, 1997). Glutamin miktarının artışı ve amonyum nitrat miktarının azalışı birçok tahıl türünde embriyo gelişimini arttırmaktadır (Datta vd., 1990; Jähne ve Lörz, 1995).

Kültür ortamına konulan jel ya da katılaştırıcı ajanlarda anter kültüründe önemlidir. Kao (1981) Ficoll 400'ün bölünen mikrosporları kültür ortamının yüzeyinde tutarak, anaerobik koşulların olumsuz etkilerinden koruduğunu belirtmiştir. Ficoll daha kaliteli embriyoların üretilmesine sebep olarak yeşil bitki rejenerasyonun artmasına neden olur. Kuhlman ve Foroughi-Wehr (1989) % 20'lik Ficoll ile sıvı bir kültür ortamı hazırlayarak arpada yeşil bitki üretiminin daha yüksek olduğunu

göstermişlerdir. Ximing vd. (1994) de arpa anter kültüründe Ficoll, agaroz ve arpa nişastasının performanslarını karşılaştırmış ve bütün genotipler için en başarılı sonuçları Ficoll ortamından almışlardır. Bununla beraber Hou vd. (1993) ve Devaux vd. (1993) double haploid bitki üretimi için Ficoll'ün çok pahalı olduğunu belirtmiş ve sıvı ortam, Gelrite ile sıvı ya da sadece Gelrite gibi diğer ajanları kullanmıştır. Bu çalışmamızda da, sıvı BAC1 ortamı hazırlanmasında Ficoll kullanıldı.

Anter kültüründe belirli birkaç bitki büyüme regülatörü kullanılmaktadır. Genellikle başlangıç ve rejenerasyon ortamlarında 2,4-D, IAA, IBA, NAA gibi oksinler ya da alternatif olarak kinetin, zeatin ribozit gibi sitokininler kullanılmıştır (Luckett ve Darvey, 1992). Ayrıca özellikle buğday için PAA kullanılmıştır (Ziauddin vd., 1992). Luckett ve Smithard (1995) büyüme regülatörü kombinasyonları ve miktarları bakımından farklı genotiplerin ihtiyaçlarını belirlemeye çalışmıştır. Cho (1991), androgenezisin başarıya ulaşması için, anter dokularının fizyolojik durumuna göre hormonlara optimum seviyelerde ihtiyaç duyulduğunu ve bir anti-oksin olan TIBA'nın androgenik bölünmeyi teşvik ettiğini ileri sürmüştür.

Anter kültürü metoduyla bitki rejenerasyonu için yapılan çalışmalarda kullanılan bir diğer büyüme regülatörü NAA'dır. Kintzios vd. (1996) yaptıkları çalışmada bitki rejenerasyonu için en iyi NAA konsantrasyonunu 1.0 mg/l olarak bulmuşlardır. Chin ve Scott (1977) ve Ahlowalia (1982) bu özel NAA konsantrasyonun buğday kallusunun kök oluşumu için optimum miktar olduğunu ileri sürmüşlerdir. Kintzios vd. (1996) 1.0 mg/l NAA uygulamasının, bitki rejenerasyon safhası esnasında, *T.aestivum* ve *T. durum* embriyolarından elde edilen kalluslarda kök oluşum oranını arttırdığını rapor etmiştir. Bununla beraber, farklı kültür fazlarında, kallus dokusunda kök formasyonu en iyi 0.5 mg/l NAA konsantrasyonunda gerçekleşmiştir.

Chin ve Scott (1977), NAA (1.0 mg/l) ve kinetin (5.0 mg/l) kombinasyonu uygulamasıyla, buğday kallusundan başarılı bir gövde oluşum oranı elde etmiştir. Bununla beraber Sharma vd. (1981) *Triticale* embriyoları için ve Kintzios vd. (1996) *T. durum* ve *T. aestivum* embriyoları için, büyüme regülatörlerinin bu kombinasyonunun, gövde oluşumunda, NAA'nın tek başına uygulanmasından daha

az başarılı olduğunu ileri sürmüşlerdir. Çalışmamızda başlangıç ortamında (BAC1) 0.5 mg/l NAA, 1.0 mg/l BAP, rejenerasyon ortamında (MS) 1.0 mg/l NAA ve 1.0 mg/l BAP büyüme regülatörleri kullanıldı.

İnkübasyon sırasındaki ışığın nitelik ve niceliği ya da sıcaklık gibi çevresel koşullar anter kültüründen sağlanacak başarı üzerinde etki yapan diğer bir grup faktördür. Başlangıçta anterler genellikle karanlıkta ve 20-30 °C' ler arasında kültüre alınmaktadır. Kültürün ilerleyen aşamalarında düşük ışık yoğunluğu (2000 lüks) ve değişik günlük ışıklandırma sürelerinde bekletilen anterlerde embriyo oluşumu gerçekleşikten sonra; rejenerant bitkiler daha yüksek ışık yoğunluğuna (3000-10000 lüks) sahip koşullara aktarılmaktadır. Yaptığımız çalışmada başlangıç kültür ortamına alınan anterler, 25°C sıcaklıkta ışıksız ortamda kallus oluşumuna kadar tutuldu ve daha sonra 16/8 gün/gece fotoperiyodu koşullarında inkübasyona alındı.

İnkübasyon süresince uygulanması gereken ışık yoğunluğu ile sıcaklık arasında çok kuvvetli bir korelasyon bulunmaktadır. Düşük ışık yoğunluğunda sıcaklığında düşük olması, ışık yoğunluğunun artırılması halinde sıcaklığında buna paralel olarak artırılması gerekmektedir (Babaoğlu vd., 2002).

Buğday anter kültüründe haploid yeşil bitki üretiminin düşük olması ciddi bir problemdir (Doğramacı-Altuntepe vd., 2001). Yapılan bir çalışmada araştırmacılar 10 durum buğdayı çeşidinden alınıp kültürleri yapılan anterlerden tek bir yeşil bitki elde edememişler sadece haploid albinolar gözlemişlerdir. Tahıllarda anter kültürü ile yeşil bitki üretiminin kompleks genetik faktörlerin kontrolü altında olduğunu belirtmişlerdir (Ekiz ve Konzak, 1991). Jähne ve Lörz (1995) albino arpa bitkilerinin olgun kloroplast taşımadığını ve mikrospor kültür yoluyla elde edilen albino pirinç bitkilerinin plastit genomlarında büyük oranda delesyon meydana geldiğini bildirmişlerdir. Mikrosporların plastit genomlarındaki eksiklik veya yokluk durum buğdayında haploid albino bitkilerin gelişimine neden olabilir.

Tuzluluğun bitki üzerindeki etkileri, nem, sıcaklık, sulama ve gübreleme gibi faktörlere bağlı olarak değişebilmektedir (Kantar ve Elkoca, 1998). Yüksek tuz konsantrasyonunun bitkilerde yarattığı sıkıntılar suyun ozmotik olarak tutulmasından

kaynaklanmaktadır. Su, tuz çözeltilerinde ozmotik olarak tutulmaktadır. Böylelikle tuz konsantrasyonu artarken, bitkilere suyun girişi daha az gerçekleşmektedir.

Tuz stresi, bodurlaşmaya ve kök büyümesinin engellenmesine yol açmaktadır. Abdel Aleem vd. (1992), (EC 7, 14 , 21 mmhos/cm) ve Konak vd. (1999) (EC 8, 16, 24 mmhos/cm) yüksek tuz konsantrasyonlarında, ekmeçlik ve makarnalık buğday çeşitlerinin tümünde kök boyunda belirgin azalmalar olduğunu belirtmişlerdir.

Kültür ortamındaki NaCl varlığı, olgun buğday embriolarından kallus oluşumu için bir engel değildir ama oluşum fazında kallus büyümesine negatif etki yapar. Tuz içeren ortamda optimal büyüme için kültür hücrelerinin adaptasyonu muhtemelen spesifik iyonlara toleranstan çok su stresine uyum göstermeleri sonucunda olur (Kintzios vd., 1997). Arzani ve Mirodjagh, 28 durum buğdayı çeşidinin olgunlaşmamış embriyo kültürü, kallus üretimi ve *in vitro* tuz toleransına cevabını NaCl'nin farklı konsantrasyonlarının bulunduğu (0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5, 1.8 ve 2.1 % w/v) kültür ortamlarını kullanarak araştırmış ve en iyi genotiplerin PI 40 100 ve Dipper-6 olduğunu bulmuştur. Bu çalışmada tuz toleranslarını belirlemek için, durum buğdayı genotiplerinden elde edilen kalluslar, 0, 0.5, 1.0 ve 1.5 mMol NaCl içeren MS ortamlarına alındı. Fakat haploid bitki elde edilemedi.

Kintzios vd. (1997), yüksek tuz konsantrasyonlarında köklenmenin oldukça fazla olduğunu bulmuşlardır. 2,4-D özellikle düşük konsantrasyonlarda kullanıldığında, yüksek NaCl konsantrasyonunda oluşan kök formasyonunun, kontrol ortamında oluşan kök formasyonundan önemli derecede geniş olduğunu belirtmişlerdir. O'Hara ve Street (1978) kallustaki kök formasyonunun yüksek 2,4-D seviyelerinde (5-10 mg/l) inhibe olduğunu bulmuşlardır (Kintzios vd., 1997). Francisko ve Akao (1993) 2,4-D regülatörünün buğdayın lateral köklerinde hücre genişlemesine neden olduğunu belirtmişlerdir. Bu etki düşük oksin konsantrasyonlarında (0.3-0.6 mg/l) görülmüştür. 2,4-D regülatörü suyun hücreler tarafından alınmasını ve sonuçta da hücre hacminin artmasını sağlar. Böylece büyük hücreler turgorlarını yüksek tuz seviyelerinde devam ettirebilirler. Yani 2,4-D tuz stresine karşı hücrenin toleransını NaCl ile kaybedilen suyu dengelemek sureti ile artırır. Diğer bir bakımdan 2,4-D yüksek konsantrasyonlarda kullanıldığı zaman devamlı hücre bölünmesini teşvik

edebilir. Böylece ortalama hücre hacmi sabit kalır. Bu bağlamda, ortamdaki düşük Na^+ seviyesinin ek olarak hücre bölünmesini teşvik etmesi de muhtemeldir (Muralitharan vd., 1993).

Sonuç olarak; durum buğdayı genotipleri Kunduru 1149, Berkmen 469 ve DH-Berkmen, bitki yetiştirme odasında uygun ısı ve ışık koşullarında saksılara ekimleri yapılarak yetiştirilmiştir. Toplanan başakların yüzey sterilizasyonları yapılmış ve $+4^{\circ}C$ sıcaklıkta soğuk önışleme maruz bırakılmıştır. Soğuk önışlemeden alınan başaklardaki anterler kontrol edilmiş ve tek çekirdekli mikrosporları içeren anterler BAC1 başlangıç ortamına alınmıştır. Bu çalışmada 2680 anter kullanılmış ve 14 kallus elde edilmiştir. En yüksek kallus miktarını Berkmen 469 genotipi, 15 gün soğuklama periyodundan sonra kültür ortamına alınması ile vermiştir. Kültüre alınan anter sayısına göre üretilen kallus miktarının çok düşük olduğu gözlemlenmiştir. Bununla beraber bu çalışma, makarnalık buğday genotiplerinin doku kültürü çalışmalarına uyumunun zor olduğunu göstermektedir. Elde edilen kalluslar tuz konsantrasyonları farklı olan MS rejenerasyon ortamlarına alınmıştır. Fakat bitki rejenerasyonu sağlanamamıştır. Bu çalışma makarnalık buğday genotiplerinde haploid bitki üretimine giderken kullanılacak uygun kültür ortamı, genotip ve optimum önışlem zamanını belirlemede yardımcı olmuştur.

6. KAYNAKLAR

- Abdel Aleem, M. M. M., Sabry, S. R. S., Hana, N. S., 1992. Seedling Characteristics as Selection Criteria for Salinity Tolerance in Wheat. *Rachis*, 11, 33-40.
- Ağaoğlu, Y. S., Ellialtıgolu, Ş., Marasalı, B., Kalyon, D., 1998. Asmada (*Vitis vinifera* L.) Androgenetik Kallus Oluşumu Üzerine Araştırmalar. II. Uluslar arası Kızılırmak Fen Bilimleri Kongresi, 88-89, 20-22 Mayıs, Kırıkkale.
- Ahloowalia, B. S., 1982. Plant Regeneration from Callus Culture in Wheat. *Crop Sciences*, 22, 405-410.
- Almansouri, M., Kinet, J. M., Lutts, S., 1999. Effects of Salt and Osmotic Stresses on Germination in Durum Wheat (*Triticum durum* Desf.). *Journal of Plant Physiology*, 155, 274-280.
- Alpaslan, M., Güneş, A., Taban, S., Erdal, İ., Tarakçıoğlu, C., 1998. Tuz Stresinde Çeltik ve Buğday Çeşitlerinin Kalsiyum, Fosfor, Demir, Bakır, Çinko ve Mangan İçeriklerinde Değişmeler. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 22, 227-233.
- Anonim, 2000. www. FAO.org.
- Arzani, A., Mirodjagh, S. S., 1999. Response of Durum Wheat Cultivars to İmmature Embryo Culture, Callus İnduction and in vitro Salt Stres. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 58, 67-72.
- Avcıoğlu, R., Demiroğlu, G., Khalvati, M. A., Geren, H., 2003. Ozmotik Basıncın Bazı Kültür Bitkilerinin Erken Gelişme Dönemindeki Etkileri II. Prolin, Klorofil Birikimi ve Zar Dayanıklılığı. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 40, 9-16.
- Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S., 2002. Bitki Biyoteknolojisi I: Doku Kültürü ve Uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, 374s, Konya.
- Bajaj, Y. P. S., 1983. *In vitro* Production of Haploids. *Mc Millon Publish*, 6, 228-287.
- Bourgin, J. P., Nitsch, J. P., 1967. Obtention de *Nicotiana tabacum* a Partir D'atamines 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 Sciences*, 32, 1108-1112.
- Bullock, W. P., Baenziger, P. S., Schaffer, G. W., Bottino, P. J., 1982. Anther Culture of Wheat (*Triticum aestivum* L.) F₁'s and Their Reciprocal Crosses. *Theoretical and Applied Genetics*, 62, 155-159.

- Chin, J. C., Scott, K. J., 1977. Studies on the Formation of Roots and Shoots in Wheat Callus Cultures. *Annals of Botany*, 41, 473-481.
- Cho, U. H., 1991. Hormonal Aspects of Androgenetic Induction in Barley (*Hordeum vulgare* L.). ph D Thesis, University of Guelph, Canada.
- Chowdhury, M.A.M., Moseki, B., Bowling, D.J.F., 1995. A Method for Screening Rice Plants for Salt Tolerance. *Plant and Soil*, 171, 317-322.
- Cistue, L., Ramos, A., Castillo, A. M., Romagosa, I., 1994. Production of Large Number of Doubled Haploid Plants from barley anthers Pretreated with High Concentrations of Mannitol. *Plant Cell Reports*, 13, 709-712.
- Çopur, O., Oğlakçı, M., 1995. Tarımsal Üretimde Tuzluluk Sorunu ve Öneriler. *Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 1, 18.
- Daaloul, A., Slim-Amara, H., Trifa, Y., 1992. Androgenesis in vitro Quelques Genotypes Tunisiens Wheat. *Plant Cell Reports*, 351-373.
- Datta, S.K., Wenzel, G., 1987. Isolated Microspore Derived Embryogenesis and Plant Formation via Embryogenesis in *Triticum aestivum*. *Plant Science*, 48, 49-54.
- Datta, S. K., Potrykus, I., Bolik, M., Wenzel, G., 1990. Culture of Isolated Pollen of Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 13, 435-447.
- Datta, S.K., 2005. Androgenetic haploids: Factors Controlling Development and its Application in Crop Improvement. *Current Science*, 89, 11.
- Deaton, W. R., Metz, S. G., Armstrong, T. A., Mascia, P. N., 1987. Genetic Analysis of Anther Culture Response of Three Spring Wheat Crosses. *Theoretical and Applied Genetics*, 74, 334-338.
- Devaux, P., Hou, L., Ullrich, S. E., Huang, Z., Kleinhofs, A., 1993. Factors Affecting Anther Culturability of Recalcitrant Barley Genotypes. *Plant Cell Reports*, 13, 32-36.
- Dinç, U., Şenol, S., Kapur, S., Atalay, İ., Cangir, C., 1993. Türkiye Toprakları. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi. Genel Yayın, 2, 51.
- Doğramacı-Altuntepe, M., Peterson, T. S., Jauhar, P. P., 2001. Anther Culture-Derived Regenerants of Durum Wheat and Their Cytological Characterization. *The Journal of Heredity*, 92, 56-64.
- Dunwell, C. M., 1981. Influence of Genotype and Environment on Growth of Barley Embryos in vitro. *Annals of Botany*, 48, 535-542.

- Edreva, A., 1998. Molecular Bases of Stress in Plant. Bitkilerde Stres Fizyolojisinin Moleküler Temelleri. 22-26 Haziran, İzmir.
- Ekiz, H., Konzak, C. F., 1991. Nuclear and Cytoplasmic Control of Anther Culture Response in Wheat: I. Analyses of alloplasmic lines. *Crop Science*, 31, 1421-1427.
- Ellialtıoğlu, Ő., Tıprıdamaz, R., 2002. Bitki Biyoteknolojisi I: Doku Kùltürü ve Uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, 374s, Konya.
- Ergene, A., 1982. Toprak Bilimi. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakùltesi Yayınları. No: 267, Ders Kitapları Serisi, No: 42. Erzurum.
- Essa, T. A., 2002. Effects of Salinity Stres on Growth and Nutrient Composition of Three Soybean (*Glycine max. L. Merrill*) Cultivars. *Journal of agronomy and crop science*, 188, 86-93.
- Eyüpoğlu, F., 1999. Türkiye Topraklarının Verimlilik Durumu. Toprak ve Gübre Araştırma Enstitüsü Yayınları. Genel Yayın no, 220. Teknik Yayın no, T- 67.
- FAO, 1992. Production Yearbook 1991. Rome. 45.
- FAO, 2000. FAOSTAT Agriculture Database. <http://apps.fao.org/cgi-bin/nph-db.pl?subset=agriculture>.
- Finlay, K. W., Wilkinson, G. N., 1963. The Analysis of Adaptation in a Plant Breeding Programme. *Australian Journal of Agricultural Research*, 14, 742-754.
- Flowers, T. J., Troke, P. F., Yeo, A. R., 1977. The Mechanism of Salt Tolerance in Halophytes. *Annual Rewiev Plant Physiology*, 28, 89-121.
- Flowers, T. J., Yeo, A. R., 1981. Variability in the Resistance of Sodium Chlorid Salinity within Rice Varieties. *New Phytol*, 88, 363-373.
- Foroughi-Wehr, B., Wezel, G., 1993. Andro- and parthenogenesis. *Plant Breeding: Principles and Prospects*. Chapman&Hall, 261-277.
- Francisco, B. J., Akao, S., 1993. The 2,4-D İnduced Wheat Paranodules are Modified Lateral Roots with Structure Enhanced by Rhizobial Inoculation. *Plant Soil*, 157, 121-129.
- George, E. F., Sherrington, P. D., 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Eastern Press, 314-324.
- Gorham, J., 1990. Salt Tolerance in the Triticeae: Ion Discrimination in Rye and Triticale. *Journal of Experimental Botany*, 41, 609-614.

- Guha, S., Maheshwari, S. C., 1966. Cell Division and Differentiation of Embryos in the Pollen Grains of *Datura in vitro*. *Nature*, 212, 97.
- Günefl, A., Post, W.H.K., Kirkby, E.A., Aktaf, M., 1994. Influence of Partial Replacement on Nitrat by Aminoacid Nitrogen or Urea in the Nutrient Medium Accumulation in NFT Grown Winter Lettuce. *Plant Nutrition*, 17, 1929-1938.
- Gorham, J., Bristol, A., Young, E. M., Wyn Jonesh, R. G., Kashour, G., 1990. Salt Tolerance in the Triticeae: K/Na Discrimination in Barley. *Journal of Experimental Botany*, 41, 1095-1101.
- Hajrasuliha, S., 1980. Accumulation and Toxicity of Chlorid in Bean Plants. *Plant and Soil*, 55, 133-138.
- Hassawi, D. S., Qrunfleh, I., Dradkah, N., 2005. Production of Doubled Haploids from some Jordanian Wheat Cultivars via Anther Culture Technique. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 3, 161-164.
- Heun, M., Schafer-Pregl, R., Klawan, D., Castanga, R., Accerbi, M., Borghi, B., Salamini, F., 1998. Site of Einkorn Wheat Domestication Identified by DNA Fingerprinting, *Science*, 278, 1312-1314.
- Hoekstra, S., Van Bergen, S., Van Brouwersahven, I. R., Schilperoort, R. A., Heidekamp, F., 1996. The Interaction of 2,4-D Application and Mannitol Pretreatment in Anther and Microspor Culture of Crops. *Journal of Plant Physiology*, 148, 696-700.
- Hou, L., Ullrich, S. E., Kleinhofs, A., Stiff, C. M., 1993. Improvement of Anther Culture Methods for Doubled Haploid Production in Breeding. *Plant Cell Reports*, 12, 334-338.
- Hu, T., Kahsa, K., 1999. A Cytological Study of Pretreatments Used to Improve Isolated Microspore Cultures of Wheat (*Triticum aestivum* L.) cv. Chris. *Genome*, 42, 432-441.
- Huang, B., Sunderland, N., 1981. Temperature Stress Pretreatment in Barley Anther Culture. *Annals of Botany*, 49, 77-88.
- İnal, A., Günefl, A., Aktaf, M., 1995. Effect of the Chlorid and Partial Substitution of Reduced Forms of Nitrogen for Nitrate in Nutrient Solution of the Nitrate, Total Nitrogen and Chlorine Contents of Onion. *Plant nutrition*, 18, 2219-2227.
- Jähne, A., Lörz, H., 1995. Cereal Microspore Culture. *Plant Science*, 109, 1-12.
- Johansson, L., Eriksson, T., 1977. Induced Embryo Formation in Anther Culture of Several *Anemone* Species. *Physiology of Plants*, 40, 172-174.

- Kantar, F., Elkoca, E., 1998. Kültür Bitkilerinde Tuza Dayanıklılık. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 29, 163-174.
- Kao, K. N., 1981. Plant Formation from Barley Anther Cultures with Ficoll Media. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie, 103, 437-443.
- Katsuhara, M., Mimura, T., Tazawa, M., 1990. ATP Regulated Ion Channels in the Plasma Membrane of a Characeae alga, *Nitellopsis obtusa*. Plant Physiology, 93, 343-346.
- Kavi Kishor, P. B., 1988. Effect of Salt Stres on Callus Cultures of *Oryza sativa* L. Journal of Experimental Botany, 39, 235-240.
- Kintizos, S. E., Triantafyllou, M., Drossopoulos, J., 1996. Effect of Genotype and Different Growth Regulator Treatments on Callus Induction, Proliferation and Plant Regeneration from Mature Wheat Embryos. Cereal Research Communications, 24, 147-153.
- Kintzios, S. E., Barberaki, M., Aivalakis, G., Drossopoulos, J., Holevas, C.D., 1997. *In vitro* morphogenetic responses of mature wheat embryos to different NaCl concentrations and growth regulator treatments. Plant Breeding, 116, 113-118.
- Kirkby, E.A., Knight, A.H., 1987. The Influence of the Level of Nitrate Nutrition on Ion Uptake and Assimilation, Organic Acid Accumulation and Cation Anion Balance in Whole Tomato Plants. Plant Physiology, 60, 349-353.
- Kiviharju, E., Pehu, E., 1998. The Effect of Cold and Heat Pretreatments on Anther Culture Response of *Avena sativa* and *A. sterilis*. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 54, 97-104.
- Konak, C., Yılmaz, R., Arabacı, O., 1999. Ege Bölgesi Buğdaylarında Tuza Tolerans. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 5, 1223-1229.
- Kösali, N., 2000. Stark Spur Golden Delicious Elma Çeşidinde Şeker, Aktif Kömür ve Işığın *in vitro* Androgenezis Üzerine Etkileri. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 47.
- Kuhlmann, U., Foroughi-Wehr, B., 1989. Production of Doubled Haploid Lines in Frequencies Sufficient for Breeding Programs. Plant Cell Reports, 8, 78-81.
- Kumar, V., Sharma, D.R., 1989. Selection and Characterization of an L- Thiazolidine 4- Carboxylic Acid Resistant Callus Cultures of *Vignaradiata* (L.). Plant Cell Reports, 7, 648-651.
- Lashermes, P., Engin, G., Ortiz-Ferrara, G., 1991. Anther Culture of wheat (*Triticum aestivum*) adaption dry areas of West Asia and North Africa. Journal of Genetics & Breeding, 45, 33-38.

- Lashermes, P., 1992. Improved Anther Culture Method for Obtaining Direct Regeneration in Wheat *Triticum aestivum* L. Journal of Genetics & Breeding, 46, 99-102.
- Lazar, M. D., Baenziger, P. S., Schaeffer, G.W., 1984. Combining Abilities and Heritability of Callus Formation and Plantlet Regeneration in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Anther Cultures. Theoretical and Applied Genetics, 61, 131-134.
- Lazar, M. D., Schaeffer, G. W., Baezinger, P. S., 1985. The Physical Environment in Relation to High Frequency Callus and Plantlet Development in Anther Culture of Wheat (*Triticum aestivum* L.) cv. "Chris". Journal of Plant Physiology, 121, 103-109.
- Lewitt, J., 1980. Salt Stresses. In Responses of Plants to Environmental Stresses, 2, 365-454.
- Lichtenhaler, M. D., 1996. Vegetation Stress : an Introduction to the Stress Concept in Plants. Journal of Plant Physiology, 148, 4-14.
- Luckett, D. J., Darvey, N. L., 1992. Utilisation of Microspore Culture in Wheat and Barley Improvement. Australian Journal of Botany, 40, 807-828.
- Luckett, D. J., Smithard, R. A., 1995. A Comparison of Several Published Methods for Barley Anther Culture. Plant Cell Reports, 14, 763-767.
- Maas, E. V., Hoffman, G. J., 1977. Crop Salt Tolerance- Current Assesment. Journal of Irrigation and Drainage, ASCE, 102, 115-134.
- Maas, E.V., 1986. Salt Tolerance in Plants. Apply Agriculture Research, 1, 12-26.
- Meneguzzo, S., Navari-Izzo, F., Izzo, R., 1999. Antioxidative responses of shoots and roots of wheat to increasing NaCl concentrations. Journal of Plant Physiology, 154, 743-752.
- Muralitharan, M. S., Chandler, S. F., Steveninck, R. F. M., 1993. Physiological Adaptation to High Ion Concentrations or Water Deficit by Callus Cultures of Highbush Blueberry, *Vaccinium corymbosum*. Australian Journal of Plant Physiology, 20, 159-172.
- Özgen, M., 1991. Yield Stability of Winter Barley (*Hordeum sp.*) Cultivar and Lines. 6 th International Barley Genomic Symposium. 22-27 July, Hessinborg, 407-409.
- Özgen, M., Akar, T., 1993. Yabani Gen Kaynaklarının Bitki Islahında Kullanımı. I. Ulusal Ekonomi ve Çevre Kongresi, 5-7 Ekim, İzmir.

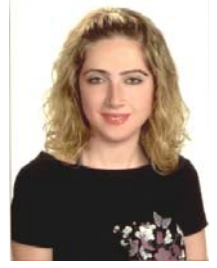
- Özkum, D., Tıprıdamaz, R., Ellialtıoğlu, Ő., 2000. Relationship between Endogenous Abscisic Acid Content of Anthers and in vitro Androgenesis in Pepper (*Capsicum annuum* L.). 4th Int. Symp. on In Vitro Culture and Horticultural Breeding, 2-7 July, 2000, Finlands.
- Pardha Sarahi, P., Mohanthy, P., 1993. Proline in Relation to Free Radical Production In Seedlings of Brassica juncea Raised under Sodium Chloride Stress. Plant and Soil, 155/156, 497-500.
- Picard, E., Rode, M., Doussinault, M., Rives, M., 1990. In vitro Production and Utilization of Doubled Haploids in Wheat *Triticum aestivum*. Biotechnology in Agriculture and Forestry, 101-121.
- Pierik, R. L. M., 1989. In vitro Culture of Higher Plants. Plant Cell Reports, 344pp.
- Piri, K., 1991. Contribution to in vitro Selection of Androgenic Wheat Plants, for Their Tolerance to NaCl. Doctorate Thesis.
- Poljakoff-Mayber, A., Gale, J., 1975. Plants in Saline Environments. Springer-Verlag, 27, 3109-3114.
- Razdan, M. K., 1992. Haploid Production. An Introduction to Plant Tissue Culture. Oxford and IBH. Pub., 105-124.
- Raina, S. K., Zapata, F. J., 1997. Enhanced Anther Culture Efficiency of India Rice (*Oryza sativa* L.) through Modification of the Culture Media. Plant Breeding, 116, 305-315.
- Reinert, J., Bajaj, Y. P. S., 1977. Anther Culture: Haploid Production and Its Significance. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 251-264.
- Reynolds, T. L., 1997. Polen Embryogenesis. Plant Mol. Biol, 33(1), 1-10.
- Rines, H. V., McCoy, T. J., 1981. Tissue Culture İnitiation and Plant Regeneration in Hexaploid Species of Oats. Crop Sciences, 21, 837-842.
- Roberts-Oehlschlager, S. L., Dunwell, J. M., 1990. Pretreatment on Mannitol Stimulates Production of Microspor-Derived Embryos. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 20, 235-240.
- Saidi, N., Cherkaoui, S., Chlyah, A., Chlyah, H., 1997. Embryo Formation and Regeneration in *Triticum turgidum* ssp. durum Anther Culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 51, 27-33.
- Savaşkan, Ç., Ellerbrook, C., Fish, L.J., Snape, J.W., 1997. Doubled Haploid Production in Turkish durum Wheats using Crosses with Maize. Plant Breeding, 116, 299-301.

- 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.
- Sears, R. G., Deckard, E. L., 1982. Tissue Culture Variability in Wheat: Callus Induction and Plant Regeneration. *Crop Science*, 22, 546-550.
- Sezer, I., Kurt, O., Köycü, C., 1998. Samsun Ekolojik Koşullarında Buğdayda Verim ve Bazı Verim Unsurlarına Farklı Ekim Sıklıkları ile Azotlu Gübre Doz ve Uygulama Zamanlarının Etkisi. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 13, 61-73.
- Sharma, G. C., Bello, L. L., Sapra, V. T., Peterson, C. M., 1981. Callus Initiation and Plant Regeneration from *Triticale* Embryos. *Crop science*, 21, 113-118.
- Siegel, S.M., Siegel, B.Z., Massey, J., Lahne, P., Chen, J., 1980. Growth of Corn in Saline Waters. *Physiol. Plant*, 50, 71-73.
- Sink, K. C., Padmanabhan, V., 1977. Anther and Pollen Culture to Produce Haploids: Progress and Application for the Plant Breeder. *Hort Science*, 12, 143-148.
- Slim-Amara, H., Benzaghoul, S., Lepoivre, P., 1999. Androgenetic Ability of Tunisian Durum Wheat (*Triticum durum* Desf.) Cultivars. *Agricultures*, 8, 334.
- Soldatini, G. F., Giannini, A., 1985. The Effect of Water and Salt Stress on the Fixation of $^{14}\text{CO}_2$ and on Amino acid Metabolism in Seedlings of *Zea Mays* L. *Agrochimica*, 29, 74.
- Sunderland, N., Roberts, M., 1979. Cold Pretreatment of Excised Flower Buds in Float Culture of Tobacco Anther. *Annals of Botany*, 43, 405-414.
- Sunderland, N., Xu, Z. H., Huang, B., 1981. Recent Advances in Barley Anther Culture. In: *Barley Genetics IV. Proc. 4th Int. Barley Genetic Symp.* Edinburg, 699-703.
- Szakacs, E., Kovacs, G., Pauk, J., Barnabas, B., 1988. Substitution Analysis of Callus Induction and Plant Regeneration from Anther Culture of Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Reports*, 7, 127-129.
- Şehrali, S., Özgen, M., 1988. Bitki Islahı. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları. 1059, Ders Kitabı:310, Ankara.
- Tomes, D.T., 1990. Current research in biotechnology with application to plant breeding. In: *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*. Kluwer Academic Publishers, 23-32.

- Touraeu, A., Indrianto, I., Vicente, Herberle-Bors, E., 1997. Initiation of Microspore Embryogenesis by Stres. Trends Plant Sci. Rev, 2(8), 297-302.
- Tulecke, W., 1953. A Tissue Derived from the Pollen of *Ginkgo biloba*. Science, 117, 599-600.
- Turan, M., Sezen, Y., 2002. Effect of Salt Stres on Plant Nutrition Uptake. International Conference on Sustainable Land Use and Management. Çanakkale.
- Van-Slageren, M. W., 1994. Wild Wheats: A Monograph of *Aegilops L.* and *Amblyopyrum (Jaub. & Spach) Eig (Poaceae)*" Veenman Drukkers, Wageningen, Hollanda.
- Van Steveninck, R.F.M., Van Steveninck, M.E., Steizer, L.F., Lauchli, A., 1982. Studies on the Distribution of Na and Cl in two Species of Lupin (*Lupinus luteus* and *Lupinus angustifolius*) Differing in Salt Tolerance. Phytology Plant, 56, 465-473.
- Woods, S. A., 1996. Salinity Tolerance of Ornamental Trees and Shrubs. Alberta Agriculture, Food and Rural Development. <http://www.agric.gov.ab.ca/soil/saltroot.html>.
- 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*). J. Plant Physiol., 151, 79-82.
- Ximing, L., Savaşkan, C., Polok, K., Bielawska, I., Szarejko, I., Maluszynski, M., 1994. The effect of media and culture conditions on androgenic response in barley. Reports Botanic Garden Polish Academy of Science, 5/6.
- Xu, Z. H., Huang, B., Sunderland, N., 1981. Culture of Barley Anthers in Conditioned Media. Journal of Experimental Botany, 32, 767-778.
- Yağdı, K., 2002. Bursa Koşullarında Yetiştirilen Ekmeklik Buğday (*Triticum aestivum* L.) Çeşit ve Hatlarının Stabilite Parametrelerinin Saptanması Üzerine Bir Araştırma. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 16, 51-57.
- Yıldırım, M. B., Öztürk, A., İkiz, F., Püskülcü, H., 1979. Bitki Islahında İstatistik-Genetik Yöntemler. Ege Bölge Zirai Araştırma Enstitüsü Yayınları, 20, 217-251.
- Ziauddin, A., Marsolais, A., Simion, E., Kahsa, K. J., 1992. Improved Plant Regeneration from Wheat Anther and Barley Microspore Culture Using Phenylacetic Acid (PAA). Plant Cell Reports, 11, 489-498.
1. <http://www.bugday.org>

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyadı : Rağbet Ezgi DURAN
Doğum Yeri ve Yılı: Antakya/1983
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce



Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Samandağ Lisesi -1999
Lisans : Süleyman Demirel Üniversitesi Biyoloji Bölümü -2004
Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl: SDÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü
2005

Yayımları (SCI ve diğer makaleler)

1-Savaskan, C., Coskun, Y., Duran, R.E., Turan, H.N. "Anadolu'nun Bazı Yerel Makarnalık Buğday Genotiplerinde Heterojen Karakterlerin Biyoteknoloji Kullanılarak Tanımlanması" II. Türk Bilim ve Teknoloji Tarihi Kongresi. 30-31 Ekim 2006, Isparta.

2-Savaskan, C., Coskun, Y., Duran, R.E., Turan, H.N. The use of genetic analysis in quantitative biological traits in durum wheat landraces. 5. Plant Genomics European Meetings, October 11-14, 2006. Venice/ ITALY.

Katıldığı Kurslar : WUEMED training course, 'Integrated approaches to improve drought tolerance in crops'.
Bologna Üniversitesi, İTALYA (5-10 Haziran, 2006)