

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BAZI BESİYERİ FAKTÖRLERİNİN MISIR (Zea mays L.) ve
ARPA (Hordeum vulgare L.) EMBRİYO KÜLTÜRLERİ
ÜZERİNE ETKİLERİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Atalay SÖKMEN

HAZİRAN - 1987

SİVAS

T. C.
Yükseköğretim Kurulu
Dokümantasyon Merkezi

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

İşbu çalışma, jürimiz tarafından, Biyoloji Anabilim
Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan

Üye

Üye

Üye

Üye

O N A Y

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine
ait olduğunu onaylarım./....../1987

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Doç.Dr. İbrahim GÜMÜŞSUYU

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosunun
05.01.1984 tarihli toplantısında kabul edilen tez yazma
yönergesine göre hazırlanmıştır.

TEŞEKKÜR

Tez konusunun seçimi ve yönetiminde yardımcı olan danışman hocam Sayın Doç.Dr. Rahmi BİLALOĞLU'na, tezimi hazırlarken yardımlarını gördüğüm Arş.Gör. Münevver SÖKMEN'e, Bölüm teknisyenlerimiz Yaşar ZÖNGÜR ve Turgut MURSAL'a ve ayrıca tezi daktilo eden Yaşar ŞENCAN'a teşekkür ederim.

İ Ç İ N D E K İ L E R

	<u>Sayfa</u>
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	9
3. MATERYAL ve METOD	29
4. BULGULAR	37
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	75
6. ÖZET	87
SUMMARY	89
7. KAYNAKLAR	91
8. RESİMLER	104

1. GİRİŞ

Çağımızda, bitki bilimi alanında görülen ilgi çekiçi gelişmelerin önemli bir bölümü bitki doku ve hücre kültürü alanında toplanmaktadır. Ülkemizde henüz gelişmekte olan bu alan, tüm dünyada güncelliğini korumakta ve yapılan araştırmalarla beraber hızlı bir gelişme görölmektedir.

Dünya nüfusunun büyük çoğunluğu beslenme gereksinimlerini bitkisel besin kaynaklarından sağlamaktadır. Bu kaynakların başında tahıllar gelmektedir. Günümüzde hızlı nüfus artışı, beslenmeye dayalı sorunları da beraberinde getirmektedir. Bu nedenle, gelecekte bu sorunlar daha ciddi boyutlara ulaşabilecektir. Bunun için mevcut besin kaynaklarının korunması ve daha verimli hale getirilmesi gerekmektedir. Aynı zamanda yeni bitki türlerinin kültüre alınması, şu anki kültür bitkilerinin ıslahı ve geliştirilmesi söz konusu olmaktadır. Kaliteli ve yüksek verimli, hastalıklara karşı daha dayanıklı bitkilerin, özellikle insanların ana besin kaynağı olan tahılların ıslahı ön plana çıkmaktadır. Bu amaç doğrultusunda, bitki ıslahçılarının elinde bulunan klasik ıslah metodları tek başına

bu sorunu çözememektedir. Bu aşamada bitki doku ve hücre kültürleri daha elverişli ve gelecek için daha ümit verici olanaklar sağlamaktadır (MELCHERS, 1977; BAJAJ, 1979). Bunlardan bitki embriyo kültürleri, bitki ıslahı ve yetiştiriciliği alanında önemli kullanım alanına sahiptir (KOBELITZ, 1972; BUTCHER ve INGRAM, 1976; BAJAJ, 1979; REINERT ve YEOMAN, 1982; KARP ve MADDOCK, 1984; ZENKTELLER ve NITZSCHE, 1984). Zira tür içi ve türler arası çaprazlamalar sonucu ortaya çıkan hibritlerin embriyoları ebeveyn doku ile uyum göstermemekte ve embriyolar kısa sürede ölmektedir (KOBELITZ, 1972). Ancak hibrit embriyolar, gelişmelerinin erken safhasında ana dokudan, yani endospermden kesilip çıkarılır ve sentetik bir besiyerinde büyütülürse, normal gelişmelerine devam edip tam bir bitkiyi oluşturabilirler. İlk kez Linum (keten) genusundaki hibritlerde ortaya çıkarılan bu önemli teknik, birçok hibrit bitkinin elde edilmesinde kullanılmıştır (LAIBACH, 1925, 1929; UTTAMAN, 1949; KONZAK et.al., 1951; FARQUHARSON, 1957; NAKAJIMA et.al., 1958; DAVIES, 1960; OETTLER, 1983, 1984; NAPIER ve WALTON, 1983; PICKERING ve MORGAN, 1983; NOWICK, 1986). Bu teknik sayesinde daha önce elde edilmesi mümkün olmayan hibritler bol miktarda elde edilmiştir (RAPPAPORT, 1954).

Dormansi faktörü ortadan kaldırılarak bitkilerde yaşam döngüsünün kısaltılması ve böylelikle ekonomik önemi olan bitkilerin kısa zamanda elde edilmesi, yine bitki embriyo kültürleri ile mümkün olmaktadır (RANDOLPH ve COX, 1943; RANDOLPH, 1945; NICKELL, 1951; KESTER ve HESSE, 1955). Keza orkidelerde embriyo kültürü bu amaç doğrultusunda yapılmıştır (TAYLOR, 1957).

Günümüzde bitki embriyo kültür teknikleri özellikle üç araştırma konusunda güncelliğini sürdürmektedir. Birincisi embriyoların soğukta, yani sıvı azot yada kuru buzda saklanması, böylelikle embriyoların sahip olduğu genetik özelliklerin gelecekte kullanılması için saklanması amacını gütmektedir. Bu teknik diğer bitki dokü kültür sistemleri için de geçerli olmaktadır (JONES, 1974; SEIBERT ve WETHERBEE, 1977, WITHERS, 1979, 1982; GROUT, 1979). Bitki embriyo kültürlerinde diğer güncel ikinci konu ise biyokimyasal mutantların elde edilmesidir. Bu konuda buğday (Triticum sp.) ve arpa (Hordeum sp.) embriyolarının kültürü oldukça elverişlidir. Tahıllarda toksinlere dayanıklı veya aminoasitçe zengin mutantlar olgunlaşmış embriyo kültürleri sayesinde elde edilmektedir (BRIGHT et.al., 1978, 1979; HIBBERD, 1980; BRIGHT et.al., 1982 a.b).

Üçüncü güncel konu olarak, uzak akraba türler ve genuslar arasında çaprazlamalardan elde edilen embriyoların kültüründen bahsedilebilir (ZENKTELLER ve NITZSCHE, 1984; OETTLER, 1984).

Bitki embriyo kültürü tekniklerinin kullanıldığı tüm araştırma alanlarında besiyerinde ve çevrede yer alan tüm faktörlerin tek tek değerlendirilmesi gerekmektedir. Aslında besiyerinde bulunan maddelerin azlığı, çokluğu, saflık derecesi ve birbirleriyle etkileşimleri embriyoların gelişimini etkileyebilmektedir. Ayrıca bu maddelerce meydana getirilen pH ve osmotik basınç değişimleri ile ısı ve ışık gibi çevresel faktörler de embriyoların in vitro koşullarda gelişimini etkileyebilmektedir (RAPPAPORT, 1954; RAGHAVAN, 1966; KOBLITE, 1972).

Kültür ortamının pH'sı kültürün etkinliğine önemli ölçüde tesir ettiği halde, bu noktayı açıklığa kavuşturacak araştırma sayısı çok azdır. Olgunlaşmamış Datura sp(tatula) embriyolarında yapılan araştırmalarda embriyo kültürün ilk dört gününde optimal pH= 7.0, daha sonraki dönemde ise 5.5 olarak bulunmuştur (Van OVERBEEK et.al., 1944). Capsella bursa-pastoris (çoban

optimum pH değeri saptanamamış ve durumun besiyerindeki diğer sınırlayıcı faktörlerin de işin içine girmiş olabileceği varsayılmıştır (RIJVEN, 1952). Embriyo kültürü için hazırlanan besiyerlerinde başlangıçtaki pH değerlerinin tüm deney süresi boyunca aynı düzeyde tutulması gerekmektedir.

Nitekim pH'daki değişimler, besiyeri iyon dengesini değiştirmekte ve normal büyüme etkilenebilmektedir (RAPPAPORT, 1954). Özellikle demir tuzlarının çökmesi pH'nın alkaliteye doğru kaymasına yol açmakta ve kültürdeki materyalin gelişimi engellenmektedir (STREET et.al., 1952). Embriyo kültürleri için pH değeri yaklaşık 6.0 dır (RAPPAPORT, 1954; RAGHAVAN, 1966). Bununla beraber, optimum pH değeri türe özgü değişimler gösterebilir. Örneğin, domates embriyoları için besiyeri pH'sı 6.8 - 7.0, pirinç embriyoları için 5.0, arpa embriyoları için 5.6 - 5.8 ve mısır için 5.8 olmaktadır (KENT ve BRINK, 1947, 1950, 1951; CHOUDHURY, 1955; SAPRE, 1963; REINERT ve YEOMAN, 1982).

Embriyo gelişimini etkileyen sıcaklık ve ışık, çevresel faktörler olarak değerlendirilmektedir. Ancak sıcaklık ve ışığın bitki embriyolarının gelişimi üzerine etkisi olduğuna dair pek az literatür vardır. Işığın *Capsella*

embriyolarında kök gelişimini engellediği ve buna karşın sürgün uzamasını ve hipokotil gelişimini teşvik ettiği gözlenmiştir (RAGHAVAN ve TORREY, 1964).

Sıcaklığın bitki embriyo kültürleri için bitki türüne göre 24 °C ila 32 °C arasında değişiklik gösterdiği bulunmuştur (Van OVERBEEK et.al., 1944; RIJVEN, 1952; CHOUDHURY, 1955).

Bitki embriyo kültürü yapılırken, karbon kaynağı olarak genellikle karbohidratlar kullanılmaktadır. Karbon kaynağı olarak kullanılan maddeler, embriyoların sürekli büyüme ve farklılaşması için gerekli enerjiyi sağlamaktadır. Bu hususta karbon kaynaklarından sukroz ve glukozun, diğer mono- ve polisakkaritlere nazaran daha üstün olduğu saptanmıştır (TUKEY, 1938; Van OVERBEEK, 1944; BALL, 1959; RAGHAVAN, 1966; REINERT ve YEOMAN, 1982). Datura türlerine ait embriyolarda çeşitli şekerler denenmiş ve sonuçta en iyi gelişim sukroz içeren besiyerinde gözlenmiştir (DOERPINGHAUS, 1948). Bazı orkide türlerinde ise embriyoların glukoz, fruktoz veya maltoz içeren besiyerlerinde daha iyi büyüdüğü gözlenmiştir (KNUDSON, 1941). Mısır ve arpa embriyoları için en iyi karbon kaynağı sukroz olarak bulunmuştur (ZIEBUR ve BRINK, 1947, 1950, 1951; NORSTOG,

1961; REINERT ve YEOMAN, 1982).

Kültür ortamının karbohidrat (şeker) konsantrasyonları da önemli ölçüde etkili olmaktadır. Şeker konsantrasyonlarındaki artış ortamın osmotik basıncını artırmakta ve böylelikle embriyoların gelişimi etkilenmektedir (RAPPAPORT, 1954). Arpa embriyolarıyla yapılan araştırmalarda bu etkinin küçük embriyolarda daha bariz olduğu gözlenmiştir (ZIEBUR ve BRINK, 1951; NORSTOG, 1961).

Öte yandan besiyerinin sterilizasyon şekli de kültürlerin gelişimi üzerine önemli rol oynamaktadır. Zira otoklavlanan besiyerinde sukroz kısmen hidrolize olmakta, filtrasyonda ise hidroliz söz konusu olmamaktadır (PILET ve GOLAZ, 1985). Hidrolizlenen sukroz ve ışığın kök gelişimini engellemediği, buna karşın filtrasyona tabi tutulan besiyerindeki sukroz ile ışığın kök gelişimini etkilediği, mısır (Zea mays L.) kök kültürlerinde gözlenmiştir (PILET ve GOLAZ, 1985).

Kültür ortamına ek besleyici faktör olarak ilave edilen hindistan cevizi sütü, arpa ve mısır endospermeleri, domates suyu ve kazein hidrolizat gibi maddeler bitki embriyolarının in vitro gelişimini teşvik edebilirler. Ancak bu maddeler besiyerinde, pH ve osmotik basınçta

değişimlerde bulunabildiklerinden, embriyoların in vitro koşullarda gelişimlerini etkileyebilirler (Van OVERBEEK, 1944; ZIEBUR ve BRINK, 1947, 1950, 1951; NORSTOG, 1961; KOBLITZ, 1972).

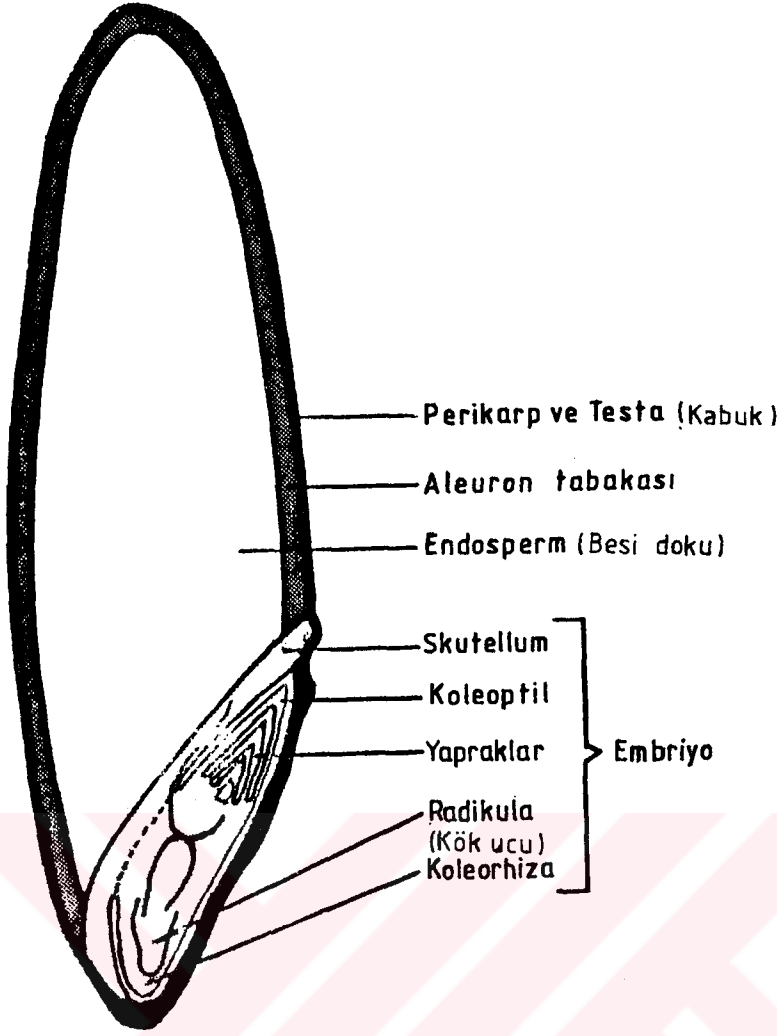
Bu çalışmada pH, sukroz konsantrasyonları ve değişik şekerler içeren besiyerlerinin arpa (Hordeum vulgare L.) ve mısır (Zea mays L.) embriyolarının in vitro gelişimleri üzerine etkileri araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mısır (Zea mays L.) ve arpa (Hordeum vulgare L.) bitkilerinin tohum ve embriyo anatomileri :

Mısır ve arpa bitkileri Poaceae (Gramineae, buğdaygiller) familyası üyeleridir. Bu nedenle Gramineae tohum ve embriyolarında gözlenen temel özellikler mısır ve arpa bitkilerinde de görülmektedir (Şekil 1 ve 2).

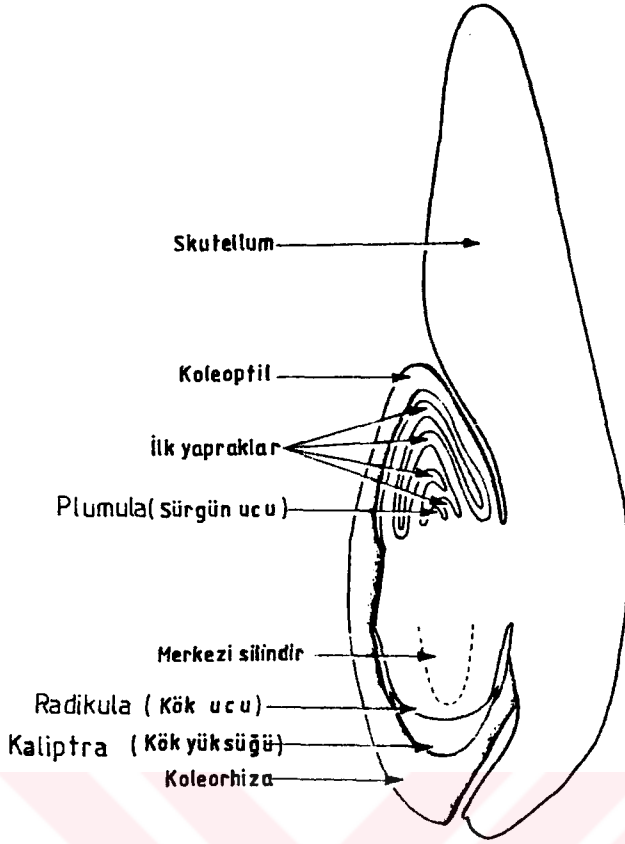
Gramineae tohumları aslında açılmayan kuru meyveler olup, karyopsis adını alırlar. Karyopsis üç ana kısım içermektedir. Karyopsisin en dış kısmı; perikarp, testa ve nusellusun kaynaşması ile oluşan karyopsis kabuğu (ya da "tohum" kabuğu) ile örtülüdür. Karyopsisin iç kısmında endosperm ve embriyo yer alır. Perikarp, testa ve nusellusun kaynaşmasıyla meydana gelen sert kabuk, dış ortam ile tohum içindeki embriyo ve dokular arasında gaz ve sıvı alış-verişine çok az izin verir. Dolayısı ile tohumdaki dokular ve embriyonun, gelişim ve metabolizmalarını düzenleyici bir rol oynar. Ayrıca bu sert kabuk buğdaygiller familyası üyeleri için tipikdir. Gramineae üyelerinin diğer tipik bir özelliği de, endospermelerinde bir dış alevron tabakası içermeleridir. Alevron tabakası, endosperm



Şekil 1. Arpa bitkisinin tohum ve embriyo yapısı (Moore, 1981 den)

hücrelerinin kabuk kısmına yakın olanlarının bölünmeleri ve sonuçta bir yada birkaç tabaka oluşturmaları ile meydana gelir. Buradaki hücrelerce protein yapısında aleuron tanecikleri oluşturulur. İç kısımdaki endosperm hücreleri zamanla ölür ve nişasta tanecikleri ile dolar.

Endosperm besi doku olduğundan, embriyo gelişimi açısından büyük öneme sahiptir. Mısır endospermünde % 11 protein, % 5 lipid ve % 75 nişasta depolanmıştır. Arpa



Şekil 2. Mısır bitkisinin embriyo yapısı (Weier, 1974 den)

endosperminde ise % 12 protein, % 3 lipid ve % 76 nişasta depolanmıştır (BEWLEY ve BLACK, 1983). Endospermden ayrılan embriyonun in vitro koşullarda gelişimi için gerekli tüm maddelerin besiyerinde bulunması gerekir (RAGHAVAN, 1966).

Mısır ve arpa embriyoları da yapı olarak tipik Gramineae özellikleri taşımaktadır. Embriyo bir kotiledon taşıyan embriyonik eksen içerir. Embriyonik eksen hipokotil, plumula ve radikula olmak üzere üç ana bölümden ibarettir. Dikotil bitkilerin embriyolarında gözlenen mezokotil; mo-

nokotillerde, özellikle Gramineae'de zor gözlenir. Monokotil embriyolarının tek kotiledonu endosperme doğru bir emeç gibi uzanır ve skutellum adını alır. Skutellum bir miktar besin maddesi içerebilir. Örneğin; arpada bu içerik çok az iken, mısır embriyolarında nisbeten daha zengindir.

Embriyonik ekseninde yer alan hipokotil, kotiledonun (skutellumun) bağlandığı kısımdır. Hipokotilden ayırdedilmesi güç olan ikinci yapı radikuladır. Radikula primer kök taslağı olup, karyopsisten çıkan ilk organdır. Hipokotilin taban kısmı radikulayı çevreler ve bu yapıya koleorhiza adı verilir. Embriyonal ekseninde yer alan üçüncü ana kısım plumuladır. Plumula ilk yaprak yada yaprakçıkları ve sürgün ucunu içerir. Sürgün ucu kılıf benzeri bir yapı ile örtülüdür ve bu kılıfa koleoptil adı verilir. Koleoptilin yapısı hakkında çeşitli görüşler vardır. Bazı araştırmacılara göre ilk gerçek yaprak, diğerlerine göre ise bir kotiledon parçasıdır (FAHN, 1981).

Embriyonal gelişimde en önemli görevi skutellum görür. Skutellum endosperm ile temas halindedir ve embriyo için gerekli besin maddelerini emer. Mısır skutellumu, endosperme temas bölgelerinde kıvrımlar oluşturur. Bu

kıvrımlarda yer alan epitel benzeri hücreler salgı fonksiyonu görerek, endospermdeki besin maddelerinin embriyo tarafından alınmasına yardımcı olurlar (FAHN, 1981).

Gelişen bitki embriyolarında, beslenme şekline göre iki safha mevcuttur; heterotrofik ve ototrofik safha. Hayvan embriyoları ise sadece heterotrofik safhada kalmaktadır. Bu iki safha bitki embriyolarının beslenme işlevleri açısından çok önemlidir. Bitki embriyosu kotiledon oluşturana kadar heterotrofiktir. Daha sonra ototrofik safhaya geçer. Bu safhaların bilinmesi bitki embriyo kültürünün yapılması açısından çok önemlidir. Zira embriyo ototrofik, yani yeterince bağımsız olduğunda izole edilebilir ve in vitro şartlarda kültürü yapılabilir (RAGHAVAN, 1966).

2.2. Bitki doku ve hücre kültürü teknikleri :

Bitki organ, doku ve hücre kültürü teknikleri düşünce olarak ilk kez 20. yüzyıl başlarında ortaya atılmıştır (HABERLANDT, 1902). Bununla beraber, bitki doku ve hücre kültürü tekniklerinde gözlenen gelişmeler 1930 lu yıllarda başlamıştır. 1960 lı yıllara kadar, sadece bitkilerde gözlenen büyüme ve gelişme sorunları ile ilgilenen

bu teknikler; bugün genetik, biyokimya, bitki fizyolojisi, fitopatoloji ve bitki ıslahı alanlarında vazgeçilmez deneysel olanaklar sunmaktadır (KOBLOITZ, 1972; BUTCHER ve INGRAM, 1976).

Bitki doku ve hücre kültürü ile yapılan araştırmalarda yapılan yer alan terimler, çoğu kez karmaşık ve gelişkilili olmuştur. Bu terimler aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir (STREET, 1973; BUTCHER ve INGRAM, 1976):

a) Organ kültürleri : Kök ve sürgün uçları, yaprak ve çiçek primordiumları, çiçeklerin olgunlaşmamış parçaları (ovaryum, anter, polen gibi) ve olgunlaşmamış meyve kısımlarından yapılan kültürlerdir.

b) Embriyo kültürleri : Olgunlaşmış yada olgunlaşmamış embriyoların kültürleridir.

c) Kallus (doku) kültürleri : Bitki doku parçalarının yetiştirilme tekniğidir. Buradaki hücreler düzensiz olarak çoğalır ve kültürde bir yığın (kallus) oluştururlar.

d) Hücre süspansiyon kültürleri : Sürekli çalkalanan sıvı besiyerinde dağınık olarak bulunan hücreleri ve hücre kümelerini içeren kültürlerdir. Süspansiyon kültür-

leri, diğer kültür sistemlerine nazaran daha düşük organizasyon düzeyi gösterdiklerinden, hücre kültürleri adını da alabilirler (BUTCHER ve INGRAM, 1976).

Bitki embriyo ve organ kültürlerinde yararlanılan embriyo ve diğer bitki organ yada organ parçaları, karakteristik yapılarını in vitro koşullarda da koruyabilirler. Bu açıdan bitki organ ve embriyo kültürleri, normal dokulardaki gelişimin kaybolduğu bitki doku ve hücre (suspansiyon) kültürlerinden belirgin bir şekilde ayrılabilir. Ayrıca in vitro şartlarda gelişen organ ve embriyolar, normal bitkilerde gelişenler ile karşılaştırılabilir (BUTCHER ve INGRAM, 1976). Ancak, in vitro koşullarda bitki organ ve embriyolarının normal koşullara göre daha hızlı gelişmesi, karşılaştırmada sorunlar yaratmaktadır (KOBELITZ, 1972).

2.3. Bitki embriyo kültürü :

Kimyasal içeriği bilinen bir besiyerinde bitki embriyolarının kültürü ilk kez 20. yüzyıl başlarında gerçekleştirilmiştir (HANNIG, 1904). Bununla beraber, bitki doku ve hücre kültür tekniklerinden biri olarak önemini 1920 li yıllarda kazanmıştır (LAIBACH, 1925, 1929).

Başlangıcından bugüne kadar bitki embriyo kültürlerinin uygulama alanları şu şekilde sınıflandırılabilir :

a) Çimlenme evresinde bazı fizyolojik ve histolojik gelişimlerin incelenmesinde,

b) Genetik karakterlerin daha önce başarılamayan yada düşünülmesi bile söz konusu olmayan kombinasyonların, yani hibrit bitkilerin elde edilmesinde,

c) Bazı tohumlarda dormansi faktörünün ortadan kaldırılması, böylelikle ekonomik önem taşıyan bitkilerin kısa sürede elde edilmesinde,

d) Embriyoların çok düşük sıcaklıkta saklanması ve gelecekte sahip oldukları bazı gerekli özelliklerinden daha ekonomik şekilde yararlanılmasında,

e) Özellikle arpa ve buğdayda embriyo kültürü ile mutant bitkilerin seçilmesinde bitki embriyo kültürleri kullanılmaktadır.

Gramineae türlerinde embriyo gelişim ve çimlenmeleri üzerine yapılan bir araştırmada, endospermin gelişimindeki etkisi araştırılmıştır. Sonuçta bir türe ait endospermi içeren besiyerinde, farklı bir türe ait embriyonun da gelişebileceği gözlenmiştir (STINGL, 1907).

Buğday (Triticum aestivum L.) embriyolarının çavdar (Secale cereale L.) endosperminde, yulaf (Avena sp.) embriyolarının da buğday endospermelerinde daha iyi gelişme gösterdiğine dair ilginç bir sonuç elde edilmiştir (STINGL, 1907). Bitki embriyolarının kültüründe önemli bir fizyolojik davranış ilk kez Ipomea sp. ve Althea sp. embriyolarında gözlenmiştir (DIETERICH, 1924). Bu bitkilerin olgunlaşmış tohumlarından izole edilen embriyolar, agarlı besiyerinde normal çimlenme yolunu izlemişler, buna karşılık olgunlaşmamış tohumlardan izole edilenler, normal embriyogenez evrelerini tamamlamadan doğrudan çimlenmişlerdir. Agarlı besiyerinde embriyoların bu davranışına "erken çimlenme" adı verilmiştir (DIETERICH, 1924). Gerçekte bu olayın besiyeri osmotik konsantrasyonundan kaynaklandığı, daha sonraki araştırmalarda ortaya konmuştur (RAPPAPORT, 1954; RAGHAVAN, 1966).

Bitki embriyo kültürleri kullanılarak, çimlenme evresindeki bitkilerin bazı anatomik ve histolojik özellikleri açığa çıkarılmıştır. Örneğin, bazı Gramineae embriyolarında, embriyonal eksen ile skutellum arasındaki ilişki araştırılmıştır. Sonuçta skutellumları kesilmiş embriyolarda kök ve sürgün uçları oluşmamış, buna karşılık

skutellumun kendisi kültüre edildiğinde kök benzeri yapılar geliştirmiştir (NARAYASWAMI, 1963). Mısır bitkisinin olgunlaşmamış embriyoları ile yapılan bir araştırmada, embriyonal eksenindeki şişkin bölgede oluşan küçük bir doku halkasının evrimsel süreç içerisinde kaybolan mısır embriyosunun epiblastını temsil edebileceği, bu yapının doğada kotiledonlu yapıya katılabileceği öne sürülmektedir (VASIL et.al., 1983). Mısır bitkisine ait olgunlaşmamış embriyoların başlangıç materyali olarak kullanıldığı doku kültürü çalışmasında, skutellumun kallus orijini olduğu gözlenmiştir (SPRINGER, 1979). Bu tür histolojik araştırmalar, arpa embriyo kültürlerinde de gerçekleştirilmiştir. Özellikle çeşitli boyutlardaki arpa embriyolarının değişik aminoasitler veya kazein hidrolizat içeren çeşitli besiyerlerindeki gelişimleri gerçekleştirilerek, histolojik incelemeler yapılmıştır (NORSTOG, 1961).

Bitki embriyo kültürlerinin en yaygın kullanıldığı alan, hibrit bitkilerin elde edilmesine yönelik araştırmalardır. Gerek tür içi, gerekse türler arası çaprazlamalar sonucunda steril (kısır) hibritler elde edilmektedir. Çoğunlukla bu kısırılık, hibrit bitkilere ait embriyolar ile endospermiler arasındaki uyumsuzlıktan kaynaklanmaktadır.

Zira hibrit bitkilerde normal dölleme gözlenmesine karşılık, embriyolar kotiledon oluşturmamadan kurumaya başlamaktadır (SATINA, RAPPAPORT, BLAKESLEE, 1950).

Embriyolarda gözlenen bu kuruma, endospermden gerekli besin maddelerini sağlayamadıklarından dolayı ortaya çıkmaktadır (SACHET, 1948). Nitekim buğday ve çavdar arasındaki çaprazlamalarda embriyoların büyük bir kısmı yaşamamaktadır (KROLOW, 1970). Burada kesin neden bilinmemektedir. Muhtemelen endosperm gelişimi ile ilgili olmalıdır. Çünkü bazı melezlerde tam gelişmiş endospermden, kuvvetli şekilde buruşmuş endosperme kadar geçiş formları görülmektedir. Tohum çimlenmesi bu gelişime bağlıdır. Tetraploid buğday ile çavdar arasında yapılan çaprazlamalarda genellikle endosperm dejenerasyonu görülür, Bu yüzden canlı melezleri elde etmek güçtür. Olgunlaşmamış embriyo kültürü ile bu melezlemeler başarıyla sürdürülebilir (KROLOW, 1985).

Sonuç olarak hibrit embriyolarının gelişimi için mutlaka diğer kaynaklardan besin elde etmesi gerekmektedir. Bu aşamada bitki embriyo kültürü gündeme gelmektedir. Bu konuda ilk araştırma Linum hibritlerinde gerçekleştirilmiştir (LAIBACH, 1925, 1929).

Bitki embriyo kültürü sayesinde, bazı Gramineae türlerinde hibrit bitkiler elde etmek için pekçok araştırma yapılmıştır. Mısır, arpa, buğday ve çeltik (Oryza sativa L.) bitkilerinde tür içi çaprazlamalarla elde edilen melezlere ait embriyolar, olgunlaşmamış safhalarında kültürleri yapılarak tam bitkiler elde edilmiştir (UTTAMAN, 1949; KONZAK, 1951; NAKAJIMA et.al., 1958; DAVIES, 1960; BOUHARMONT, 1961). Ayrıca türler arası çaprazlamalar yapılarak hibrit bitkileri elde etmek için, olgunlaşmamış embriyo kültürünün kullanıldığı çok sayıda araştırma vardır. Buğdaygillerde bu tür araştırmalara şu örnekler verilebilir: Hordeum vulgare L. X Secale cereale L., Triticum durum Desf. X Elymus arenarius L., Triticum aestivum L. X Secale cereale L., Tripsacum sp. X Zea sp., Hordeum vulgare L. X Hordeum bulbosum L., Agropyron trachycaulum L. X Agropyron intermedium L., Oryza sativa L. X Oryza latifolia Desf., Secale cereale L. X Hordeum bulbosum L., Secale cereale L. X Zea mays L., Triticum aestivum L. X Zea mays L. (BRINK, COOPER ve AUSHERMANN, 1944; FARQUHARSON, 1957; OETTLER, 1983, 1984; PICKERING, 1983; THOMAS ve PICKERING, 1983; NAPIER ve WALTON, 1983; ZENKTeller ve NITZSCHE, 1984; KROLÓW, 1970,

1985; NOWICK, 1986). Yine bitki embriyo kültüründen yararlanılarak normal ve hibrit bitkilerin embriyolarında gözlenen bazı sitolojik ve histolojik değişimler incelenmiştir (GREEN ve PHILLIPS, 1975; OZIAS - AKINS ve VASIL, 1982; MADDOCK et.al., 1983; THOMAS ve PICKERING, 1983; KARP ve MADDOCK, 1984).

Ekonomik öneme sahip bazı bitkilerde dormansi faktörü nedeni ile yaşam döngüleri uzun olmakta ve bu nedenle yetiştirilmeleri zor, masraflı ve zaman alıcı olmaktadır. Bitki embriyo kültüründen yararlanılarak bu bitkiler kısa zamanda ve daha ekonomik olarak elde edilmektedir (KOBLITZ, 1972). İlk kez Iris bitkisinde embriyo kültür tekniklerine yer verilmiş, normalde iki yıllık dinlenme periyodu atlatılarak, bitki kısa sürede elde edilmiştir (RANDOLPH, 1945). Aynı teknik, ekonomik öneme sahip orkide-lerde (Orchis sp.) denenmiş ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (TAYLOR, 1957). Genelde embriyonal gelişimlerini tamamlayamadan ölen elma, armut, şeftali gibi bitkilere ait embriyoların kültürü de başarıyla yapılmıştır. Böylelikle meyve ağaçlarının ıslahı için gerekli zaman süresi kısaltılmaktadır.' (KOBLITZ, 1972).

Bitki hücre, doku ve embriyolarının kültüre alındıktan sonra çok düşük sıcaklıkta saklanması konusu gıncelliğini sürdürmektedir (SEIBERT ve WETHERBEE, 1977).

Çok düşük sıcaklıklarda bitki embriyo kültürlerinin saklanmasında olgunlaşmış embriyolar, olgunlaşmamış olanlara göre daha avantajlıdır. Zira olgunlaşmış embriyolar çok az su içeriğine sahiptirler ve kuru buz yada sıvı azotta kolaylıkla saklanabilirler. Buna karşılık olgunlaşmamış embriyolar ve diğer bitki doku kültürleri yüksek su içerikleri nedeni ile daha ayrıntılı tekniklere gereksinim duyarlar (WITHERS, 1982). Kùltürler çok düşük sıcaklıklarda saklama işleminden önce dimetilsülfoksit (DMSO), gliserol yada prolin içeren besiyerlerinde 3-4 gün bekletilerek hücreler arası sıvıda yada besiyerinde yüksek osmotik konsantrasyonlar elde edilmektedir. Böylelikle hücreler arası sıvının donma noktası düşürölmekte ve hücre içi sıvıda letal buz kristallerinin oluşumu engellenmektedir. Özellikle prolin'in mısır hücre süspansiyon kültürlerinin çok düşük sıcaklıklarda saklanmasında etkin bir soğuktan koruyucu madde olduğu ortaya çıkarılmıştır (WITHERS ve KING, 1979). Doğada; tuz stresine karşı halo-fit bitkilerde, soğuk veya kuraklığa karşı, kurak ve soğuk

bölgelerde yaşayan bitkilerde yüksek prolin içeriği ilginçtir (STEWART et.al., 1974; BLUM et.al., 1976). Prolin; yüksek çözünürlüğe sahip, nötral, yüksek osmotik basınç sağlayan ve yüksek konsantrasyonları toksik olmayan bir maddedir (BLUM et.al., 1976). Bu özellikleri sayesinde prolin, doğal soğuktan koruyucu bir aminoasit olmaktadır (WITHERS, 1979). Bitki doku ve hücre kültürlerinin çok düşük sıcaklıklarda saklanması konusunda, havuç (Daucus carota L.) hücre süspansiyon kültürleri, 100 gün ile 2 yıl arasında -20 °C, -70 °C ve -190 °C de bekletildiği araştırmadan başarılı sonuçlar elde edilmiştir (BAJAJ, 1976). Özellikle soyu tükenmekte olan yada endemik bitkiler canlı olarak veya tohum halinde de saklanabilirler. Ancak bu durum uygun seraların ve tüm koşulların hazırlanması, bitkilerin bakımı, üretimi gibi ekonomik faturası yüksek olanaklar gerektirmektedir (FRANKEL ve SOULE, 1981). Oysaki bitki doku kültürlerinin çok düşük sıcaklıklarda saklanması yer, zaman ve ekonomik değerler yönünden büyük avantajlar sağlamaktadır. Bitkilerin canlı veya tohum halinde yada doku ve hücre kültürleri yapılarak çok düşük sıcaklıklarda saklanmasında temel amaç; germplazmin depolanması (başka bir deyişle gen bankalarının kurulması), böyle-

likle bitkilerde korunan özelliklerin gerektiğinde kullanılmasıdır. (WITHERS ve STREET, 1977; WITHERS ve KING, 1979; GROUT, 1979).

Biyokimyasal mutantların seçiminde arpa ve buğday embriyo kültürleri geniş olarak kullanılmaktadır (BRIGHT 1978, 1979, 1982 a,b). Tahıllarda yer alan proteinler insanlar tarafından beslenme amacı için doğrudan tüketilmektedir. Dolayısıyla danelerinde yüksek miktarda aminoasitleri içeren mutantlar tarımsal öneme sahiptirler. Bu nedenle arpa ve buğday olgunlaşmış embriyoları, önce sodyum azid gibi değişik mutajen ajanlar ile muamele edilmekte, daha sonra in vitro koşullarda kültürleri yapılmaktadır.

Bir lizin analogu olan S - (2 - Aminoetil) L - sistein (AEC) içeren besiyerlerinde, arpa embriyolarının gelişiminin engellendiği gözlenmiş ve bu engellemenin ortama lizin ilavesi ile ortadan kalktığı gözlenmiştir. Sonuçta AEC'ye dirençli bitkiler elde edilmiştir (BRIGHT et.al., 1979). Yine olgunlaşmış arpa embriyolarında threonin aminoasiti birikiminden sorumlu olduğu düşünülen iki gen (lt 1 ve lt 2) bulunmuştur (BRIGHT et.al., 1982 b).

Bitki embriyo kültürü ile yapılan bu tür çalışma-

lar, bakteri ve tek hücreli organizmalarda uygulanan mutant tip elde etme tekniklerine oldukça benzerlik göstermektedir. Arpa ve buğday embriyo kültürleri bu tür araştırmalara şu avantajları sağlamaktadır:

a) Skutellumlarında besin maddeleri çok azdır. Dolayısıyla çimlenmeleri doğrudan besiyeri içeriğine bağlıdır.

b) Sodyum azid gibi mutajen maddeler uygulanarak, kolaylıkla mutantlar elde edilebilir.

c) Kendine döllek olan bu bitkilerin, kendi aralarında çaprazlanmaları ile homozigot resesif mutant bireyler elde edilebilir (BRIGHT et.al., 1982 a).

Bu tür araştırmalarda hedef iki ana noktada toplanmaktadır.

1. Aspartik asit türevli aminoasitlerde gözleendiği gibi, herhangi bir aminoasitin miktarı artırılarak tohumların besin kalitesi iyileştirilebilir. Özellikle lizin ve threonin beslenme açısından gerekli aminoasitlerdir. Bu aminoasitler açısından tahıl tohum proteinleri eksiklik gösterir. Bu aminoasitlerce zengin mutant bitkiler tarımsal öneme sahip olacaklardır.

2. Özellikle klor içeren herbisitlere karşı, tahıllarda direnç elde edilebilir. Böylelikle yabancı otlara karşı mücadelede daha etkili olunabilir (BRIGHT et.al., 1979; HIBBERD et.al., 1980; BRIGHT et.al., 1982 a, b).

2.4. Besiyerleri :

Normal bitkilerde gözlenen gelişmelerin, bitki doku ve hücre kültürlerinde yetiştirilen hücre, doku ve organlarda da görülebilmesi için azot, fosfor, demir, magnezyum, mangan, bakır, çinko, bor, molibden, kükürt ve potasyum elementlerine gereksinim duyulmaktadır. Genellikle bu elementler kültür ortamına mineral tuzlar halinde verilirler (BUTCHER ve INGRAM, 1976).

Embriyo kültürlerinden yararlanılan ilk araştırmalarda, normal bitkilerin beslenmeleri hakkında yapılan deneylerde kullanılan çözeltilere yer verilmiştir (DIETERICH, 1924). Bitki embriyo kültürleri için günümüzde kullanılan makro ve mikro elementler yine mineral tuzlar halinde kullanılmakta ve konsantrasyonları nisbeten daha yüksek olmaktadır (MURASHIGE ve SKOOG, 1962; KOBLITZ, 1972).

Işık altında büyüyen ve fotosentez yeteneğini sürdüren normal bitkilerden farklı olarak bitki kültürleri-

nin gereksinim duyduğu karbon kaynağı organik formdadır ve çoğu kez şekerlere yer verilmektedir (RAPPAPORT, 1954; RAGHAVAN, 1966, KOBLITZ, 1972; BUTCHER ve INGRAM, 1976). Bitki embriyo kültürlerinde çoğunlukla şeker olarak sukroz (sakkaroz) kullanılmaktadır (RAPPAPORT, 1954, RAGHAVAN, 1966).

Bitki embriyo kültürlerinde ek besleyici maddeler olarak B vitaminleri (Pyridoxin, Thiamin, Nikotinik asit), büyüme hormonları yada hindistan cevizi sütü gibi karmaşık bitkisel maddelere, ayrıca kazein hidrolizata da gereksinim duyulabilir (ZIEBUR ve BRINK, 1947, 1950; NORSTOG, 1956, 1961; RAGHAVAN, 1966). Besiyerlerinde şayet hindistan cevizi sütü, çeşitli bitki endospermeleri ve domates suyu gibi bitki özütlerine yer verilirse, bu tip besiyerlerine "tanımlanamayan besiyerleri" denir. Zira bu kompleks maddelerin bütün içeriği tam olarak belli değildir. Besiyerlerinin içerdiği tüm maddelerin nitel ve nicel özellikleri biliniyorsa, bu tip besiyerlerine "tanımlanan besiyerleri" denir (BUTCHER ve INGRAM, 1976).

Bitki embriyo kültürleri yüzey kültürleri olduğundan, besiyerleri agar ile katılaştırılır ve kullanılan bitki embriyolarına bağlı olarak pH değeri, HCl yada

NaOH ile optimum noktaya ayarlanır (RAPPAPORT, 1954; REINERT ve YEOMAN, 1982).

In vitro koşullarda kültürü yapılan bitki embriyoları sıvı halde oksijen ve hidrojene, gaz halinde ise oksijene gereksinim duyarlar (BUTCHER ve INGRAM, 1976).

Kısaca özetlemek gerekirse; normal bitkilerin çoğunda gözlenen ototrofik beslenme, bitki doku ve embriyo kültürlerinde heterotrofiktir (BUTCHER ve INGRAM, 1976).



3. MATERİYAL ve METOD

3.1. Materyal :

Bu çalışmada olgunlaşmış mısır ve arpa embriyolarından yararlanılmıştır. Hasarlı, renksiz tohumların embriyoları ile diseksiyon esnasında yaralanan yada endosperm-den tam ayrılmamış embriyoların kullanımından kaçınılmıştır.

3.2. Metod :

3.2.1. Tohumların yüzey sterilizasyonu ve su emmesi (imbisyon) işlemleri :

Mısır ve arpa tohumları sert yapılı olduklarından embriyoların hemen kesilip, tohumun geri kalan kısmından izole edilmesi mümkün olmamaktadır. Tohumlar önce yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Daha sonra su alarak şişme olayının ardından yumuşayan tohumlardan embriyolar kesilip çıkarılarak, steril besiyeri içeren tüp yada petri kutularına aktarılmıştır.

Yüzey sterilizasyonu için arpa ve mısır tohumları ayrı ayrı olacak şekilde Pyrex tüplere (160 x 20 mm) yerleştirilmiş, tüplerin ağız kısmı gazlı bez ve lastik bant ile sıkıca kapatılmıştır. Tohumlar önce % 95 lik etil al-

kolde 10 saniye, % 1 lik Tween 20 çözeltisinde 1 dakika bekletilmiştir. Yüzey gerilimini azaltan bu çözeltinin ardından tohumlar % 2 lik kalsiyum hipoklorit çözeltisine aktarılmıştır. Bu çözeltide 15 dakika bekletilen taneler daha sonra "Sylvania G 30 T 8" marka UV lamba ile sterilize edilen transfer kabinine alınmıştır. Hipoklorit izlerini gidermek için tohumlar kabin içinde steril distile su ile üçer kez yıkanmıştır. Bu sırada petri kutuları (120 mm) içine yerleştirilen filtre kağıtları steril distile su ile ıslatılmış ve üzerlerine yine steril koşullar altında tüplerden çıkarılan mısır ve arpa tohumları yerleştirilmiştir. Petri kutularının etrafı parafilm ile sarıldıktan sonra karanlıkta, 25 °C ve 6 saat süre ile etüvde bekletilmiştir. Bu süre sonunda su emerek yumuşayan tohumlardan embriyoların diseksiyonu işlemleri yapılmıştır.

3.2.2. Embriyoların diseksiyonu için kullanılan

araç ve gereçlerin sterilizasyonu :

Embriyoların diseksiyonu için gerekli olan pens, bistüri gibi aletler ile diseksiyon alanı önceden steril edilmiştir. Pens, bistüri ve makaslar Pastör fırınında 180 °C ve 30 dakika bekletilerek sterilize edilmiştir.

Diseksiyon iğnesi ve distile su otoklavda 1.5 atm. de basınç altında, 121 °C ve 17 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Tüm diseksiyon aletleri steril kabine aktarıl原因arak, % 70 lik etil alkolde bekletilmiştir. Diseksiyon alanı % 70 lik etil alkolle silinmiş ve UV lamba ile 2 saat süre ile sterilize edilmiştir.

3.2.3. Embriyoların diseksiyonu :

Bu işlem için tohumlar steril pens ve bistüri ile açılmış ve embriyolar çıkarılmıştır. Steril distile su ile yıkanan embriyolar, yine steril filtre kağıtları ile hafifçe kurulanmıştır. Son işlem olarak dörder adet mısır ve altışar adet arpa embriyoları skutellumları besiyerine temas edecek şekilde petri kutularına yerleştirilmiştir. Aynı şekilde arpa ve mısır embriyoları deney tüplerinde birer adet olacak şekilde yerleştirilmiştir.

3.2.4. Besiyerleri :

Bu çalışmada MURASHIGE ve SKOOG (MS), (1962) besiyerinden uyarlanan bitki embriyo kültürlerine özgü besiyeri kullanılmıştır (Tablo 1) (REINERT ve YEOMAN, 1982). Besiyerinde bulunan mikroelementlerin miktarları çok düşük olduğundan stok çözeltiler halinde hazırlanmışlardır.

Tablo 1. Mısır ve arpa embriyolarının kültürü için kullanılan besiyerinin içeriği (REINERT ve YEOMAN, 1982)

Makroelementler (mg/lt)		Organik maddeler (mg/lt)	
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	88.8	Sukroz ^x	40000.0 ^x
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	27.2	Nikotinik asit	1.0
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.0	Pyridoksin	0.2
KCl	29.8	Thiamin HCl	0.2
KH_2PO_4	81.6	Kazein hidrolizat	500.0
MgSO_4	48.0	Agar	1000.0
Mikroelementler (mg/lt)		pH ^x	5.8 ^x
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.04		
H_3BO_3	0.04		
KI	0.04		
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2.0		
$\text{NH}_4\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.04		
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.04		

^x Değerler çalışma amaçlarına uygun olacak şekilde değiştirilmiştir.

Aynı işlem makroelementlere de uygulanmış ve her iki stok çözelti daha sonra birleştirilmiştir. Çökelmeden kaçınmak için stok çözeltideki her madde iki kez distile edilmiş suda iyice çözünmüşlerdir. Genellikle stok çözeltiler besiyeri son hacminin (1 lt) içerdiği madde miktarının yüz katı oranında hazırlanıp, daha sonra istenen orana seyreltilmiştir. Böylelikle zamandan kazanılmış ve besiyerinde çok düşük miktarlarda bulunan elementlerin tartım güçlüğü sorunu çözümlenmiştir.

Bitki embriyolarının gelişimine etki edebilecek pH, farklı sukroz konsantrasyonları ve değişik şekerler gibi bazı besiyeri faktörleri incelendiğinden, Tablo 1 de yer alan bazı değerler değiştirilmiştir. Kontrol grubu için % 4 lük sukroz içeren ve pH'sı 5.8 olan besiyerleri kullanılmıştır. Farklı sukroz konsantrasyonları için sırası ile; % 2, % 4, % 6, % 8 ve % 10 luk sukroz konsantrasyonları (v/w^x) hazırlanmış ve pH 5.8 e ayarlanmıştır. Değişik şekerlerin etkilerini incelemek için sırası ile; maltoz, glukoz, fruktoz, laktoz ve galaktoz % 4 lük konsantrasyonlarda hazırlanmış ve pH yine 5.8 e ayarlanmıştır. pH'nın mısır ve arpa embriyolarının gelişmeleri üzerine etkisini incelemek için besiyeri pH'ları deney tüplerinde sırası

$$^x_{v/w} = \text{Hacim/ağırlık}$$

ile; 4.6, 5.2, 5.8, 6.4 ve 7.0 ye ayarlanmıştır. Petri kütularındaki besiyerlerinde ise pH değerleri; 5.2, 5.4, 5.6, 5.8, 6.0, 6.2 ve 6.4 dür. Tüm besiyerlerinde makro ve mikroelementler, kazein hidrolizat ve vitaminler aynı miktarlarda tutulmuştur.

3.2.5. Besiyerlerinin hazırlanışı :

Bu amaç için hazırlanan stok çözeltiden 10 ml alınıp, 2 kez distile edilmiş su ile 1 lt ye tamamlanmıştır. Daha sonra gerekli miktarlarda vitaminler ve kazein hidrolizat tartılarak besiyerine eklenmiştir. Çalışma amacına uygun olacak şekilde farklı sukroz konsantrasyonları yada % 4 lük sukroz, maltoz, glukoz, fruktoz, laktoz ve galaktoz ilave edilmiştir.

Besiyeri pH'ları 0.1 N KOH veya 0.1 N HCl ile istenen değerlere ayarlanmıştır. Son olarak Difco - bacto agar eklenen besiyerleri (% 1, v/w), 1.5 atm basınçta, 121 °C de ve 17 dakika süre ile otoklavda steril edilmiştir. Otoklavlanma esnasında şekerlerin karamelisasyonunu önlemek için besiyerlerinin hacmi yüksek tutulmuştur (1 lt).

Besiyerlerinin aktarılacağı deney tüplerinin ağız kısmı hidrofob pamuk ile sıkıca kapatılmış ve besiyerleri

ile beraber otoklavda steril edilmiştir. Petri kutularının sterilizasyonu ise Pastör fırınında gerçekleştirilmiştir. Otoklavdan çıkarılıp biraz soğutulan besiyerleri steril koşullar altında deney tüplerine (160 x 20 mm) ve petri kutularına (90 mm) aktarılmıştır.

3.2.6. Embriyoların inkübasyonu :

Deney tüpleri ve petri kutularına yerleştirilen arpa ve mısır embriyoları öncelikle karanlık ortamda, 25 °C de ve 48 saat süre ile inkübe edilmiştir. Daha sonra kök ve koleoptil çıkışı gözlenen embriyoların yer aldığı tüp ve petri kutuları inkübatöre alınmışlardır. Burada embriyolar 25 °C de ve 16 saat aydınlık (6 x 820 lm gün ışığı floresan lambalar kullanılarak), 8 saat karanlık ortamda inkübe edilmişlerdir.

3.2.7. Ölçümlerin ve elde edilen verilerin değerlendirilmesi :

Arpa ve mısır embriyolarının gelişmeleri üzerine çeşitli besiyeri faktörlerinin etkisi; embriyoların haftalık kök, sürgün ve yaş ağırlık yönünden gelişmeleri dikkate alınarak araştırılmıştır. Her iki bitki embriyolarında da sadece ana kök ölçümü yapılmış, yan köklerin

ölçümleri söz konusu olmamıştır. Her deney tüpünde yer alan embriyoların ölçüm ve tartım değerleri bir tekrar olarak kabul edilmiş ve on tekrar yapılmıştır. Petri kutularında ise her dört ölçüm bir tekrar olarak kabul edilmiştir. Yine petri kutularında gelişen bitkiciklerinin yaş ağırlık tartımları sadece 4. haftada değerlendirilmiştir. Bununla beraber, mikroorganizmalar yada mantarlar tarafından bulaşmış petri kutuları yada deney tüplerindeki besiyerlerinde büyütülen embriyolar değerlendirilme dışı bırakılmıştır.

Elde edilen verileri karşılaştırmak için varyans analizi yapılmıştır (DÜZGÜNEŞ, 1963). Tekrar ve deney ortalamaları arasındaki farkın önem kontrolü için "Multiple Range Test" i uygulanmıştır (DUNCAN, 1955). Ortalamalar arası farklar 0.05 olasılık düzeyinde F değerlerinden büyük olduğu zaman önemli kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

pH, sukroz konsantrasyonu ve şekerler yönünden farklılıklar gösteren besiyerlerinde kültürleri yapılan mısır ve arpa embriyolarının haftalık ortalama kök, sürgün ve yaş ağırlıkları belirlenmiştir. Çalışmada iki ayrı bitki türüne ait embriyolardan yararlanıldığı için, bulgular iki bölümde incelenecektir.

4.1. Çeşitli besiyeri faktörlerinin olgunlaşmış mısır embriyo kültürü üzerine etkisi :

4.1.1. pH etkisi ;

Farklı pH'lara sahip besiyerlerinde, deney tüpleri ve petri kutularında kültürü yapılan mısır embriyolarının haftalık kök boyları Tablo 2 a ve 3 a'da görülmektedir.

Deney tüpleri ve petri kutularından elde edilen veriler arasında herhangi bir farkın olmadığını tablolardaki değerler göstermektedir. Farklı pH'larda ve petri kutularında kültürü yapılan embriyolar arasında, ilk üç hafta verileri açısından istatistiksel önemi olan farklılıklar bulunmuştur. Ancak bu farklılık 4. hafta ortadan kalkmıştır. İlk üç hafta itibarıyla en yüksek kök boyları 1. ve 2. hafta pH= 6.4 de ve 3. hafta pH= 6.0 da gözlenmiştir.

Tablo 2. Farklı pH'larda büyütülen mısır (*Zea mays* L.) embriyolarının haftalık ortalaması:
a) Kök, b) Sürgün gelişimi, c) 28. gün sonunda bitki başına düşen ortalama
yaş ağırlık. (Embriyolar 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık ortamda ve petriler-
de büyütülmüştür).

a) Kök gelişimi (mm)

pH (% 4 sukroz)	1. Hafta (Ortalama ¹ ± S.H) ²	2. Hafta (Ortalama ¹ ± S.H)	3. Hafta (Ortalama ¹ ± S.H)	4. Hafta (Ortalama ¹ ± S.H)
5.2	20.55 ± 1.28 c ³	38.00 ± 2.64 c	54.33 ± 2.36 d	64.66 ± 1.76 a
5.4	23.55 ± 2.35 bc	40.33 ± 2.02 bc	57.33 ± 2.02 cd	69.44 ± 1.84 a
5.6	25.66 ± 0.88 abc	44.11 ± 1.42 ab	60.33 ± 0.88 bc	71.33 ± 3.48 a
5.8	29.33 ± 0.28 ab	47.88 ± 2.16 ab	64.33 ± 1.20 abc	72.77 ± 0.39 a
6.0	31.00 ± 1.52 ab	49.33 ± 2.96 a	62.66 ± 1.33 bc	71.33 ± 3.17 a
6.2	32.66 ± 3.93 a	56.00 ± 5.03 a	66.66 ± 2.33 a	70.22 ± 0.61 a
6.4	32.00 ± 3.05 a	50.00 ± 0.57 a	63.00 ± 2.64 ab	71.66 ± 6.83 a

b) Sürgün gelişimi (mm)

5.2	23.00 ± 2.38 c	38.22 ± 0.40 c	67.00 ± 2.08 c	99.88 ± 8.22 a
5.4	27.00 ± 1.32 bc	45.44 ± 2.04 b	71.00 ± 2.08 bc	99.00 ± 8.50 a
5.6	28.33 ± 1.12 bc	45.66 ± 3.05 b	75.66 ± 3.52 ab	101.00 ± 5.85 a
5.8	31.66 ± 1.52 ab	49.10 ± 2.82 ab	76.55 ± 3.66 ab	103.33 ± 0.88 a
6.0	34.44 ± 5.24 a	49.33 ± 0.33 ab	78.66 ± 3.17 ab	99.33 ± 4.97 a
6.2	34.77 ± 1.77 a	54.22 ± 3.66 a	80.00 ± 0.57 a	95.66 ± 4.97 a
6.4	36.33 ± 3.33 a	54.44 ± 2.94 a	82.33 ± 2.72 a	94.66 ± 2.40 a

c) Yaş ağırlık (mg)

5.2	-	-	-	326.0 ± 28.10 c
5.4	-	-	-	331.0 ± 29.32 bc
5.6	-	-	-	400.0 ± 30.11 ab
5.8	-	-	-	467.0 ± 21.00 a
6.0	-	-	-	425.0 ± 23.27 a
6.2	-	-	-	427.0 ± 12.10 a
6.4	-	-	-	415.0 ± 18.20 a

1 Her veri 3 tekrarın ortalamasıdır

2 Standart hata

3 Her sütunda aynı harflerle belirtilen veriler 0.05 olasılık düzeyinde birbirinden farklı değildir. Farklı harflerle belirtilen veriler aynı olasılık düzeyinde birbirinden farklıdır.

Tablo 3. Farklı pH'larda büyütilen mısır (*Zea mays* L.) embriyolarının haftalık ortalama;
a) Kök, b) Sürgün gelişimi, c) Bitki başına düşen ortalama yaş ağırlık
(Embriyolar 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık ortamda ve tüplerde büyütilmiştir).

a) Kök gelişimi (mm)

pH (% 4 sukroz)	1. Hafta (Ortalama ¹ ± S.H) ²	2. Hafta (Ortalama ¹ ± S.H)	3. Hafta (Ortalama ¹ ± S.H)	4. Hafta (Ortalama ¹ ± S.H)
4.6	33.60 ± 1.51 a ³	45.00 ± 6.92 a	61.70 ± 2.72 a	65.10 ± 2.97 a
5.2	32.60 ± 1.35 a	44.50 ± 3.65 a	58.90 ± 4.91 a	65.80 ± 1.09 a
5.8	38.10 ± 2.05 a	50.50 ± 4.04 a	68.60 ± 1.82 a	73.50 ± 1.45 a
6.4	36.60 ± 1.98 a	49.60 ± 3.90 a	64.30 ± 3.34 a	70.90 ± 2.24 a
7.0	37.90 ± 2.23 a	48.90 ± 5.50 a	61.50 ± 1.60 a	65.60 ± 1.37 a

b) Sürgün gelişimi (mm)

4.6	37.00 ± 3.09 a	74.80 ± 2.29 a	105.30 ± 6.03 a	136.70 ± 5.02 a
5.2	36.00 ± 2.76 a	79.00 ± 4.81 a	118.00 ± 6.04 a	140.40 ± 2.05 a
5.8	35.20 ± 1.94 a	83.50 ± 6.38 a	120.00 ± 6.44 a	147.30 ± 2.15 a
6.4	37.30 ± 3.98 a	83.20 ± 6.23 a	119.90 ± 4.52 a	136.50 ± 2.17 a
7.0	36.90 ± 5.00 a	83.70 ± 5.49 a	117.80 ± 5.10 a	136.20 ± 7.69 a

c) Yaş ağırlık (mg)

4.6	183.30 ± 9.29 a	236.10 ± 16.10 a	298.60 ± 6.38 a	333.90 ± 11.08 a
5.2	185.30 ± 7.64 a	242.20 ± 11.06 a	308.90 ± 8.19 a	340.50 ± 13.18 a
5.8	193.30 ± 9.87 a	258.60 ± 10.75 a	327.10 ± 15.83 a	357.60 ± 10.99 a
6.4	189.50 ± 7.16 a	260.40 ± 4.50 a	318.60 ± 12.89 a	338.30 ± 16.73 a
7.0	189.70 ± 6.55 a	262.50 ± 4.52 a	319.10 ± 7.16 a	337.70 ± 12.89 a

1 Her veri 10 tekrarın ortalamasıdır

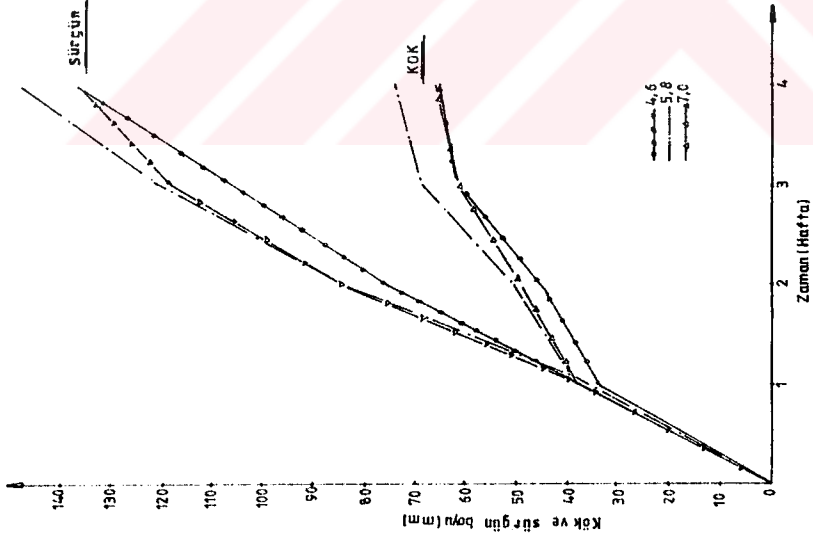
2 Standart hata

3 Her sütunda aynı harflerle belirtilen veriler 0.05 olasılık düzeyinde birbirinden farklı değildir. Farklı harflerle belirtilen veriler aynı olasılık düzeyinde birbirinden farklıdır.

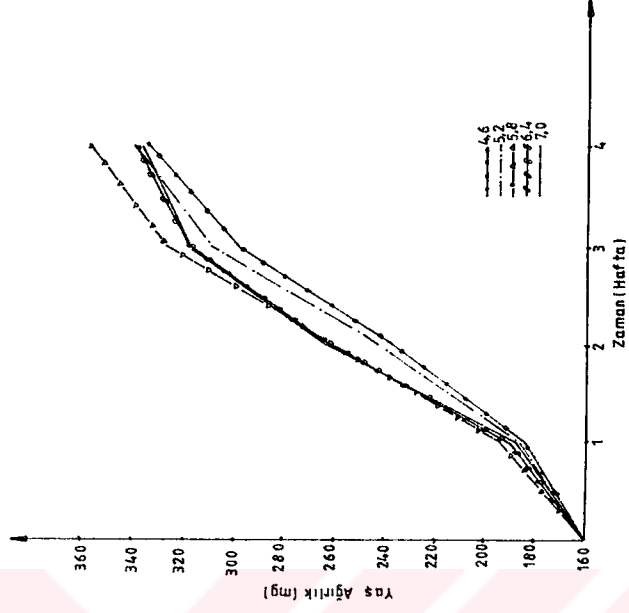
En düşük kök boyları ise 3 hafta süresince $\text{pH} = 5.2$ de yer almıştır (Tablo 2 a). Buna karşılık farklı pH 'larda ve deney tüplerinde kültürü yapılan embriyolar arasında istatistiksel önemde herhangi bir farklılık gözlenmemiştir (Tablo 3 a). Her iki kültür kabında köklerdeki gelişme hızı ilk hafta en yüksek düzeye ulaşmakta ve diğer haftalarda bu hız giderek azalmaktadır (Şekil 3).

Farklı pH 'ya sahip besiyerlerinde, deney tüpleri ya da petri kutularında kültürü yapılan mısır embriyolarının haftalık sürgün boyları Tablo 2 b ve 3 b'de görülmektedir.

Tablolardaki veriler incelendiğinde, deney tüplerinden elde edilen verilerin, petri kutularından elde edilen verilere göre daha yüksek değerler içerdiği gözlenmektedir. Diğer taraftan kök gelişmesi ile ilgili bulgular, sürgün gelişmesi ile ilgili bulgulara büyük benzerlik göstermektedir. Farklı pH 'larda ve petri kutularında kültürü yapılan embriyoların sürgün boyları arasında ilk üç hafta farklılıklar gözlenmiş ve 4. hafta bu farklılıklar ortadan kalkmıştır. Farklılığın gözlemlendiği bu haftalarda en yüksek sürgün boyu $\text{pH} = 6.4$ 'de, en düşük sürgün boyu ise $\text{pH} = 5.2$ 'de yer almaktadır (Tablo 2 b). Deney tüplerinden



Şekil 3. Farklı pH'larda kültürü yapılan mısır embriyolarının haftalık kök ve sürün gelişmesi (mm).



Şekil 4. Farklı pH'larda kültürü yapılan mısır embriyolarının haftalık yaş ağırlık gelişmesi (mg).

elde edilen sonuçlarda ise bu tür bir farklılık gözlenmemiştir (Tablo 3 b). Her iki kültür kabında da, sürgün gelişme hızı haftalar arasında fark göstermeyecek şekilde ortaya çıkmaktadır. Bu durum Şekil 3 de görülmektedir.

Aynı şartlar altında mısır embriyolarından gelişen bitkiciklerin haftalık yaş ağırlık verileri Tablo 2 c ve 3 c'de görülmektedir.

Kültür kabı olarak petri kutularının kullanıldığı tüm çalışmalarda yaş ağırlık verileri sadece 4. haftadan elde edildiği için, her iki kültür kabından alınan sonuçların karşılaştırılması 4. hafta değerlerine göre yapılmaktadır. Her iki kültür kabından elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında petri kutularındaki değerlerin daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Ayrıca bu iki kültür kabında da, farklı pH'larda gelişen bitkiciklerin yaş ağırlık verileri arasında önemli farklılıkların olduğu bulunmuştur (Tablo 2 c).

Buna karşılık deney tüplerinden elde edilen tüm verilerde böyle bir farklılığa rastlanmamıştır (Tablo 3 c). Petri kutularında ve farklı pH'larda gelişen bitkicikler en yüksek yaş ağırlık değerine pH=5.8, en düşük ise pH=5.2'de göstermiştir. Ayrıca farklı pH'larda ve petri kutularında büyütülen embriyoların kök ve sürgün veri-

leri arasında paralellik gözlenmekte, ancak yaş ağırlık bu iki karaktere uymayan verilere sahip olmaktadır (Tablo 2). Deney tüplerinden elde edilen verilerde ise bu üç karakter birbirine paralellik göstermektedir (Tablo 3). Bu kültür kabından elde edilen yaş ağırlık verilerin değerlendirildiğinde, en yüksek gelişmenin ilk hafta olduğu ve haftalar ilerledikçe bu gelişmede kademeli olarak bir azalmanın söz konusu olduğu görülmektedir. Bu durum Şekil 4 de görülmektedir.

4.1.2. Farklı sukroz konsantrasyonlarının etkisi :

Farklı sukroz konsantrasyonları içeren besiyerlerinde, deney tüpleri yada petri kutularında büyütülen mısır embriyolarının haftalık kök boyları Tablo 4 a ve 5 a'da görülmektedir.

Deney tüpleri ve petri kutularından elde edilen sonuçlar arasında herhangi bir farkın olmadığını tablolardaki veriler göstermektedir. Her iki kültür kabında büyütülen embriyolarda en yüksek kök gelişmesi ilk hafta gerçekleşmekte ve diğer haftalarda bu gelişme hızı giderek azalmaktadır (Şekil 5). Petri kutularından elde edilen sonuçlarda ilk üç hafta itibarıyla embriyolar arasında önemli farklılıklar gözlenmiş ve bu durum 4. hafta ortadan kalkmıştır.

Tablo 4. Farklı sukroz konsantrasyonlarında büyütilen mısır (*Zea mays* L.) embriyolarının haftalık ortalama; a) Kök, b) Sürgeğin gelişimi, c) 28. gün sonunda bitki başına düşen ortalama yaş ağırlık (Embriyolar 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık ortamda ve petrilere büyülmüştür).

a) Kök gelişimi (mm)

% Sukroz (pH=5.8)	1. Hafta (Ortalama ¹ ± S.H) ²	2. Hafta (Ortalama ¹ ± S.H)	3. Hafta (Ortalama ¹ ± S.H)	4. Hafta (Ortalama ¹ ± S.H)
% 2	34.10 ± 3.44 a ³	53.66 ± 1.45 a	60.00 ± 2.08 b	67.66 ± 1.20 a
% 4	29.33 ± 0.88 ab	47.88 ± 2.16 ab	64.33 ± 1.20 a	72.77 ± 3.09 a
% 6	26.66 ± 1.45 ab	46.55 ± 1.28 abc	53.66 ± 2.02 b	68.10 ± 5.60 a
% 8	24.11 ± 1.60 b	39.33 ± 3.52 bc	52.66 ± 4.25 b	64.66 ± 8.73 a
% 10	22.00 ± 3.05 b	37.33 ± 4.09 c	50.66 ± 2.40 b	63.33 ± 5.61 a

b) Sürgeğin gelişimi (mm)

% 2	26.66 ± 1.20 ab	53.33 ± 7.68 a	74.66 ± 2.90 a	100.33 ± 6.43 ab
% 4	31.66 ± 1.52 a	49.10 ± 2.80 ab	76.55 ± 3.66 a	103.33 ± 0.88 a
% 6	21.44 ± 0.77 b	43.33 ± 3.84 abc	71.33 ± 6.33 ab	84.66 ± 5.69 bc
% 8	19.00 ± 1.52 b	35.55 ± 2.44 bc	61.66 ± 3.28 b	78.00 ± 5.88 c
% 10	23.88 ± 4.13 ab	32.55 ± 0.79 c	59.33 ± 1.45 b	76.66 ± 3.17 c

c) Yaş ağırlık (mg)

% 2	-	-	-	347.0 ± 40.36 b
% 4	-	-	-	467.0 ± 21.00 a
% 6	-	-	-	305.0 ± 25.00 b
% 8	-	-	-	294.0 ± 6.00 b
% 10	-	-	-	300.0 ± 13.11 b

1 Her veri üç tekrarın ortalamasıdır

2 Standart hata

3 Her sütunda aynı harflerle belirtilen veriler 0.05 olasılık düzeyinde birbirinden farklı değildir. Farklı harflerle belirtilen veriler aynı olasılık düzeyinde birbirinden farklıdır.

Tablo 5. Farklı sukroz konsantrasyonlarında büyütilen mısır (*Zea mays* L.) embriyolarının haftalık ortalaması; a) Kök, b) Sürgün gelişimi, c) Bitki başına düşen yaş ağırlık (Embriyolar 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık ortamda ve tüplerde büyülmüştür).

a) Kök gelişimi (mm)

% Sukroz (pH=5.8)	1. Hafta (Ortalama $\pm$ S.H)	2. Hafta (Ortalama $\pm$ S.H)	3. Hafta (Ortalama $\pm$ S.H)	4. Hafta (Ortalama $\pm$ S.H)
% 2	27.50 $\pm$ 3.04 b ³	43.70 $\pm$ 1.75 a	57.90 $\pm$ 1.69 b	63.00 $\pm$ 1.16 b
% 4	38.10 $\pm$ 2.05 a	50.50 $\pm$ 4.24 a	68.60 $\pm$ 1.82 a	73.51 $\pm$ 1.45 a
% 6	22.60 $\pm$ 3.58 b	41.80 $\pm$ 2.37 ab	55.70 $\pm$ 1.57 b	61.70 $\pm$ 2.04 bc
% 8	24.30 $\pm$ 2.30 b	34.00 $\pm$ 1.63 bc	49.70 $\pm$ 1.65 c	59.10 $\pm$ 2.09 bc
% 10	23.00 $\pm$ 1.40 b	31.90 $\pm$ 3.23 c	45.20 $\pm$ 1.67 c	57.60 $\pm$ 1.41 c

b) Sürgün gelişimi (mm)

% 2	28.40 $\pm$ 1.27 b	76.20 $\pm$ 3.54 a	105.10 $\pm$ 4.18 b	131.90 $\pm$ 4.16 b
% 4	35.20 $\pm$ 1.94 a	83.50 $\pm$ 6.38 a	120.00 $\pm$ 6.44 a	147.30 $\pm$ 2.15 a
% 6	25.70 $\pm$ 1.07 bc	74.30 $\pm$ 2.69 a	107.90 $\pm$ 4.46 ab	127.60 $\pm$ 2.79 bc
% 8	25.60 $\pm$ 1.87 bc	73.50 $\pm$ 4.32 a	100.80 $\pm$ 3.00 b	125.30 $\pm$ 3.67 bc
% 10	22.60 $\pm$ 0.73 c	67.80 $\pm$ 1.99 b	98.30 $\pm$ 2.32 b	118.50 $\pm$ 3.18 c

c) Yaş ağırlık (mg)

% 2	112.20 $\pm$ 8.43 b	205.30 $\pm$ 8.46 b	289.40 $\pm$ 3.38 b	341.40 $\pm$ 6.91 b
% 4	195.30 $\pm$ 9.87 a	258.60 $\pm$ 10.75 a	327.10 $\pm$ 13.83 a	357.00 $\pm$ 10.99 a
% 6	115.90 $\pm$ 6.02 b	202.00 $\pm$ 12.96 b	290.80 $\pm$ 10.18 b	300.00 $\pm$ 4.80 b
% 8	120.80 $\pm$ 6.89 b	193.20 $\pm$ 4.58 b	279.60 $\pm$ 5.17 b	288.70 $\pm$ 3.94 b
% 10	107.80 $\pm$ 4.03 b	182.90 $\pm$ 5.85 b	273.20 $\pm$ 6.22 b	286.20 $\pm$ 4.33 b

1 Her veri 10 tekrarın ortalamasıdır

2 Standart hata

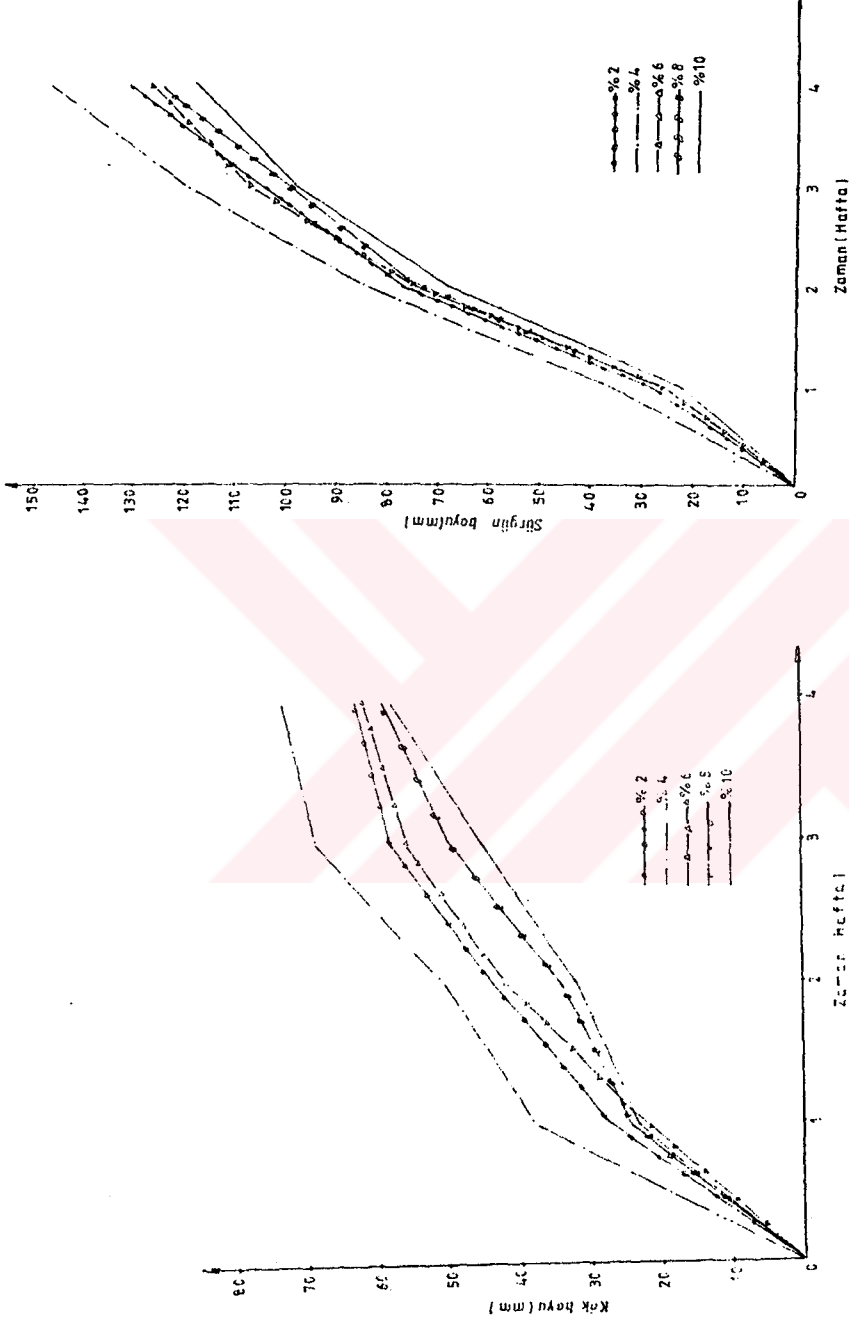
3 Her sütunda aynı haritlerle belirtilen veriler 0.05 olasılık düzeyinde birbirinden farklı değildir. Farklı haritlerle belirtilen veriler aynı olasılık düzeyinde birbirinden farklıdır.

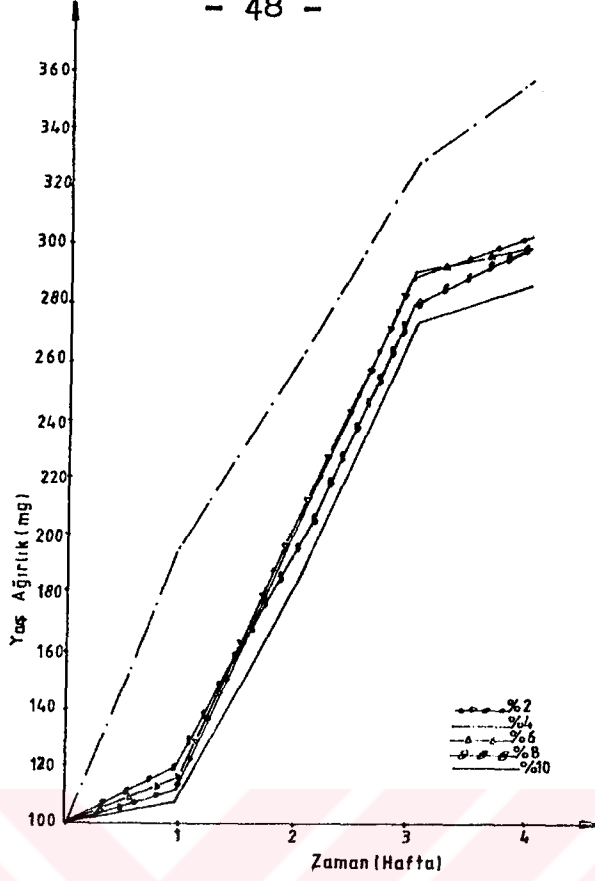
Deney tüplerinde ise istatistiksel önemi olan bu farklılıklar her hafta ortaya çıkmıştır (Tablo 5 a). Her iki kültür kabında haftalık en yüksek kök gelişmeleri % 4, en düşük ise genellikle % 10 sukroz içeren besiyerlerinden elde edilmiştir.

Aynı şartlar altındaki mısır embriyolarının haftalık sürgün boyları Tablo 4 b ve 5 b'de görülmektedir. Burada da deney tüplerinden elde edilen veriler petri kutularından elde edilenlere göre daha yüksek değerler içermektedir. Her iki kültür kabında en yüksek sürgün gelişmesi her hafta % 4 sukroz içeren besiyerlerinde gerçekleşmektedir. En düşük gelişme ise genellikle her hafta % 10 sukroz içeren besiyerlerinde gözlenmiştir. Her iki kültür kabında da sürgünlerdeki gelişme hızı haftalar arasında fark göstermeyecek şekildedir. Sadece deney tüplerindeki 2. hafta verileri biraz daha yüksektir. Bu durum Şekil 6' da görülmektedir.

Farklı sukroz konsantrasyonları içeren besiyerlerinde kültürü yapılan embriyoların geliştirdiği bitkiciklerin yaş ağırlık verileri Tablo 4 c ve 5 c'de görülmektedir.

4. hafta verilerine bakıldığında her iki kültür kabından elde edilen değerler arasında büyük bir fark ol-





Şekil 7. Farklı sukroz konsantrasyonlarında kültürü yapılan mısır embriyolarının haftalık yaş ağırlık gelişmesi (mg).

madığı görülmektedir. Ayrıca her iki kültür kabında da, farklı sukroz konsantrasyonları içeren besiyerlerinde gelişen bitkiciklere ait yaş ağırlık verileri arasında önemli farklar bulunmuştur. Bu farklılık % 4'lük sukroz konsantrasyonlarında kültürü yapılan bitkicikler ile diğer konsantrasyonlardaki bitkicikler arasında görülmektedir (Tablo 4 c ve 5 c). % 2, % 6, % 8 ve % 10 sukroz içeren besiyerlerinde kültürü yapılanlar arasında istatistiksel önemde herhangi bir farklılık gözlenmemektedir. Her iki kültür kabında da yaş ağırlık verileri % 4 sukroz içeren besiyerinde, en dü-

şük ise % 10 sukroz içeren besiyerinde kültürü yapılanlarda gözlenmiştir. Diğer taraftan deney tüplerinden elde edilen yaş ağırlık verileri incelendiğinde, en yüksek gelişmenin ilk hafta meydana geldiği ve diğer haftalarda giderek azalma gösterdiği saptanmıştır (Şekil 7).

Farklı sukroz konsantrasyonlarına sahip besiyerinde kültürü yapılan mısır embriyolarında haftalık kök, sürgün ve yaş ağırlık gelişmeleri yönünden elde edilen verilerde bir paralellik göze çarpmaktadır.

4.1.3. Değişik şekerlerin etkisi :

Karbon kaynağı olarak değişik şekerlerin kullanıldığı besiyerlerinde kültürü yapılan mısır embriyolarının haftalık kök boyları Tablo 6 a ve 7 a'da görülmektedir.

Deney tüpleri ve petri kutularından elde edilen sonuçlar arasında herhangi bir farkın olmadığını tablolaradaki veriler göstermektedir. Her iki kültür kabında da, çeşitli şekerlerin kullanıldığı besiyerlerinde kültürü yapılan embriyolar arasında kök boyları yönünden önemli farklılıklar bulunmuştur. Bu durum her hafta ölçümlerinden elde edilen tüm sonuçlar için geçerlidir. Embriyolarda haftalık kök boyları değerlendirildiğinde; en yüksek sonuçların sukroz, en düşük sonuçların ise galaktoz içeren besi-

Tablo 6. Farklı şeker içeren besiyerlerinde büyütülen mısır (*Zea mays* L.) embriyolarının haftalık ortalama; a) kök, b) sürgün gelişimi, c) 28. gün sonunda bitki başına düşen ortalama yaş ağırlık (Embriyolar 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık ortamda ve petrilere büyütülmüştür).

a) Kök gelişimi (mm)

Farklı Şeker (% 4, pH=5.8)	1. Hafta (Ortalama ¹ ± S.H) ²	2. Hafta (Ortalama ¹ ± S.H)	3. Hafta (Ortalama ¹ ± S.H)	4. Hafta (Ortalama ¹ ± S.H)
Sukroz	29.33 ± 0.88 a ³	47.88 ± 2.16 a	64.33 ± 1.22 a	72.77 ± 0.39 a
Maltoz	29.22 ± 2.58 ab	44.66 ± 8.81 a	56.33 ± 4.17 a	61.00 ± 1.00 b
Glukoz	31.33 ± 3.12 bc	34.00 ± 6.65 ab	43.99 ± 1.64 b	49.66 ± 1.25 c
Fruktoz	17.00 ± 2.08 cd	29.88 ± 1.40 bc	36.55 ± 3.25 b	40.44 ± 1.23 d
Laktoz	11.55 ± 0.79 d	17.00 ± 2.51 c	20.10 ± 1.16 c	30.44 ± 2.04 e
Galaktoz	2.55 ± 0.11 e	3.77 ± 0.27 d	4.10 ± 0.39 d	4.66 ± 0.38 f

b) Sürgün gelişimi (mm)

Sukroz	31.66 ± 1.52 a	49.10 ± 2.82 a	76.55 ± 3.66 a	103.00 ± 5.93 a
Maltoz	26.33 ± 2.64 a	41.22 ± 3.29 ab	75.00 ± 3.60 a	100.00 ± 8.71 a
Glukoz	23.88 ± 1.06 ab	36.22 ± 4.11 bc	53.00 ± 1.63 b	62.00 ± 4.72 b
Fruktoz	21.99 ± 2.60 ab	25.22 ± 0.78 c	39.22 ± 4.64 c	48.55 ± 3.85 bc
Laktoz	14.99 ± 1.50 bc	28.55 ± 2.76 c	31.22 ± 1.92 c	35.33 ± 1.93 c
Galaktoz	11.22 ± 1.54 c	13.88 ± 0.48 d	14.55 ± 0.72 d	16.66 ± 0.54 d

c) Yaş ağırlık (mg)

Sukroz	-	-	-	467.0 ± 21.00 a
Maltoz	-	-	-	397.0 ± 29.33 b
Glukoz	-	-	-	286.0 ± 14.11 c
Fruktoz	-	-	-	284.0 ± 26.02 c
Laktoz	-	-	-	216.0 ± 11.14 d
Galaktoz	-	-	-	111.0 ± 17.10 e

1 Her veri 3 tekrarın ortalamasıdır

2 Standart hata

3 Her sütunda aynı harflerle belirtilen veriler 0.05 olasılık düzeyinde birbirinden farklı değildir. Farklı harflerle belirtilen veriler aynı olasılık düzeyinde birbirinden farklıdır.

Tablo 7 . Farklı şeker içeren besiyerlerinde büyütülen mısır (*Zea mays* L.) embriyolarının haftalık ortalaması; a) Kök, b) Sürgün gelişimi, c) Bitki başına düşen yaş ağırlık (Embriyolar 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık ortamda ve tüplerde büyütülmüştür).

a) Kök gelişimi (mm)

Farklı Şeker (% 4, pH=5.8)	1. Hafta (Ortalama ¹ ± S.H) ²	2. Hafta (Ortalama ¹ ± S.H)	3. Hafta (Ortalama ¹ ± S.H)	4. Hafta (Ortalama ¹ ± S.H)
Sukroz	36.10 ± 2.05 a ³	50.50 ± 4.24 a	68.60 ± 1.82 a	73.50 ± 1.45 a
Maltoz	34.30 ± 2.18 a	48.10 ± 5.19 a	60.00 ± 0.78 b	66.40 ± 2.11 b
Glukoz	25.10 ± 1.66 b	34.70 ± 2.41 b	45.90 ± 1.40 c	54.10 ± 1.56 c
Fruktoz	25.60 ± 1.31 b	36.00 ± 1.82 b	47.00 ± 0.67 c	53.00 ± 2.14 c
Laktoz	9.30 ± 0.79 c	10.90 ± 0.87 c	17.90 ± 0.92 d	21.10 ± 1.01 d
Galaktoz	3.80 ± 0.44 d	7.70 ± 0.57 c	9.80 ± 0.66 e	12.10 ± 0.67 e

b) Sürgün gelişimi (mm)

Sukroz	35.20 ± 1.94 a	63.50 ± 6.38 a	120.00 ± 6.44 a	147.30 ± 2.15 a
Maltoz	22.60 ± 4.38 b	71.10 ± 5.32 ab	90.30 ± 2.50 b	119.00 ± 4.75 b
Glukoz	19.10 ± 1.10 bc	60.20 ± 2.24 b	81.20 ± 0.74 c	98.50 ± 7.93 c
Fruktoz	17.30 ± 1.44 bc	58.20 ± 2.93 b	78.70 ± 2.57 c	98.70 ± 5.90 c
Laktoz	13.50 ± 0.76 cd	17.10 ± 1.12 c	20.30 ± 0.87 d	25.40 ± 0.83 d
Galaktoz	9.00 ± 0.87 d	11.50 ± 0.45 c	14.00 ± 0.71 d	18.00 ± 0.49 d

c) Yaş ağırlık (mg)

Sukroz	193.30 ± 9.87 a	258.66 ± 10.75 a	327.10 ± 15.83 a	357.60 ± 10.99 a
Maltoz	183.80 ± 2.69 a	210.30 ± 8.24 b	289.60 ± 4.15 b	331.90 ± 22.92 b
Glukoz	121.70 ± 5.04 b	154.60 ± 4.73 c	208.70 ± 2.80 c	268.90 ± 9.68 c
Fruktoz	124.10 ± 4.53 b	152.30 ± 3.75 c	191.60 ± 1.84 c	264.08 ± 16.83 c
Laktoz	89.80 ± 2.39 c	95.60 ± 1.86 d	109.20 ± 4.79 d	154.03 ± 2.99 d
Galaktoz	81.70 ± 2.40 c	87.90 ± 1.34 d	95.10 ± 1.39 d	108.08 ± 3.05 e

1 Her veri 10 tekrarın ortalamasıdır

2 Standart hata

3 Her sütunda aynı harflerle belirtilen veriler 0.05 olasılık düzeyinde birbirinden farklı değildir. Farklı harflerle belirtilen veriler aynı olasılık düzeyinde birbirinden farklıdır.

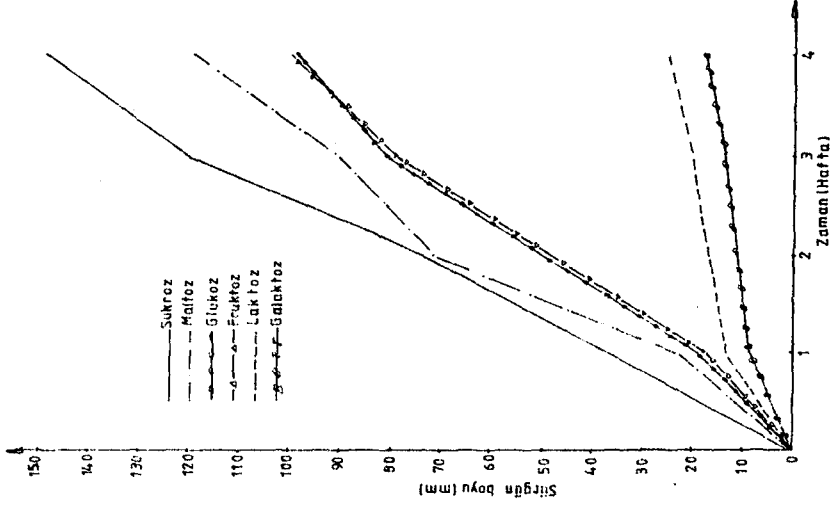
yerlerinden elde edildiği görülmektedir. Nitekim deney tüplerinden elde edilen son hafta değerleri incelendiğinde; sukrozlu besiyerinde ortalama kök boyu 73.50 mm iken, galaktozlu besiyerinde 12.10 mm dir (Tablo 7 a). Mısır embriyolarında sukrozlu besiyerinden sonra en iyi kök gelişmesini maltozlu besiyerleri sağlamaktadır. Glukoz ve fruktozlu besiyerleri de kök gelişmesi üzerine etkili olmakta, ancak maltoz ve sukrozlu besiyerlerine göre daha ez etkinlikte kalmaktadır. Laktozlu besiyerlerinde ise haftalık kök gelişmesi zayıf olmakla beraber, galaktozlu besiyerlerine göre etkinliği daha yüksek olmaktadır. Tüm bu bulgular her iki kültür kabı için geçerlidir. Haftalık kök gelişmesi en yüksek düzeyde olmak üzere ilk haftada gerçekleşmekte ve zamanla kademeli olarak azalmaktadır. Bu durum Şekil 8 de görülmektedir.

Aynı koşullar altında kültürü yapılan embriyolarda haftalık sürgün boyları Tablo 6 b ve 7 b'de görülmektedir.

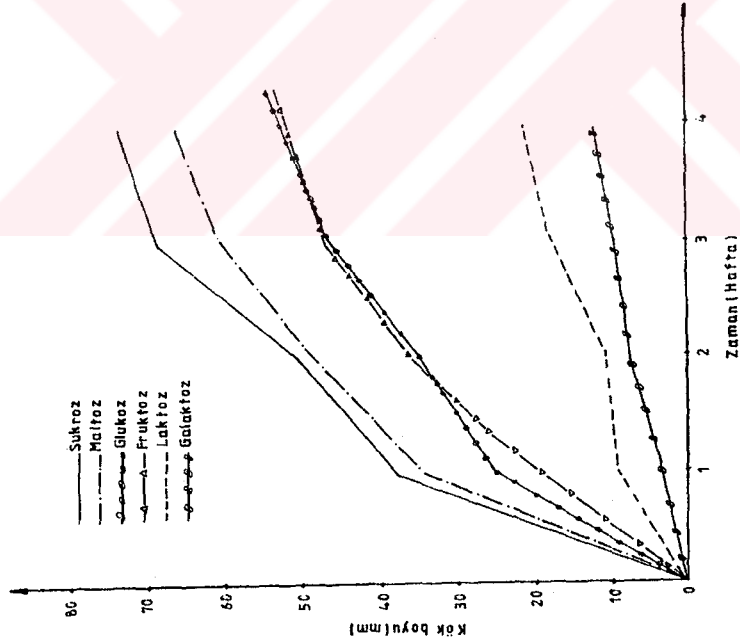
Tablolardaki veriler karşılaştırıldığında, deney tüplerinden elde edilen verilerin daha yüksek değerler içerdiği gözlenmektedir. Haftalık sürgün gelişmeleri yönünden, farklı şekerlerde kültürü yapılan embriyolar

arasında önemli farklılıklar bulunmuştur. Bu farklılıklar her iki kültür kabından elde edilen tüm haftalık ölçüm sonuçları için geçerlidir. Mısır embriyolarında her hafta en yüksek sürgün değeri sukrozlu besiyerinde, en düşük değer ise galaktozlu besiyerlerinde gerçekleştiği gözlenmiştir. Örneğin; deney tüplerinden elde edilen son hafta değerleri incelendiğinde, sukrozlu besiyerinde ortalama sürgün boyu 147.30 mm iken, galaktozlu besiyerinde 18 mm lik bir değer ortaya çıkmıştır (Tablo 7 b). Mısır embriyolarında sukrozlu besiyerinden sonra en iyi koleoptil gelişmesini maltoz, glukoz ve fruktozlu besiyerleri sağlamaktadır. Laktoz ve galaktozlu besiyerinde ise sürgün gelişmesinin zayıf olduğu gözlenmiştir. Tüm bulgular her iki kültür kabı için de geçerlidir (Tablo 6 b ve 7 b). Diğer taraftan petri kutularında sürgün gelişme hızı en yüksek ilk haftada gerçekleşmekte iken, deney tüplerinde söz konusu gelişme hızı 2. haftada gözlenmektedir (Şekil 9).

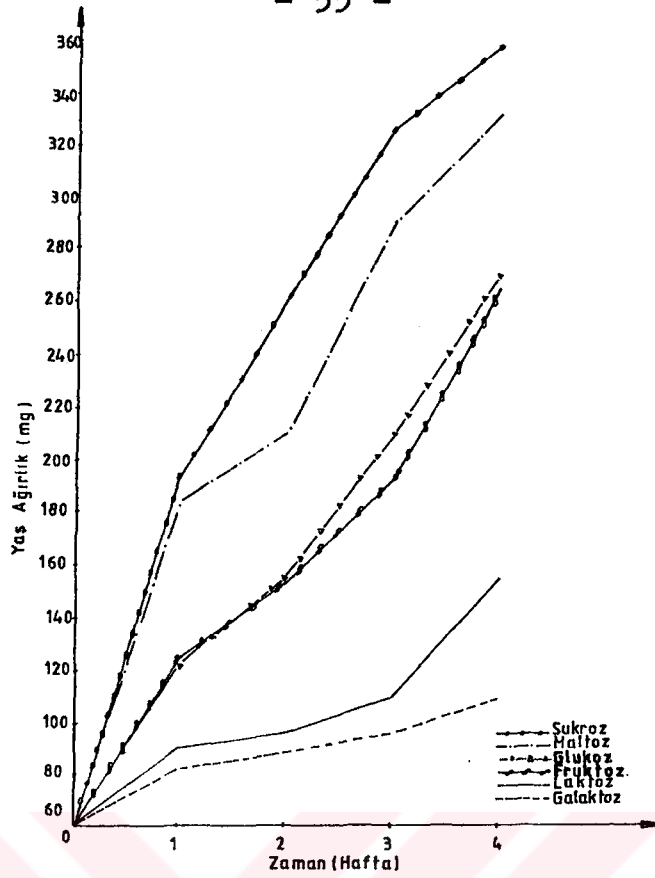
Değişik şekerler içeren besiyerlerinde yetişen bitkiciklerin ortalama yaş ağırlık verileri Tablo 6 c ve 7 c' de görülmektedir. Bu karakter yönünden de her iki kültür kabından elde edilen sonuçlar arasında bir paralellik olduğu göze çarpmaktadır. Deney tüpleri ve petri kutuları



Şekil 9. Değişik şekerler içeren besiyerlerinde kültürü yapılan mısır embriyolarının haftalık sürgün gelişmesi (mm).



Şekil 8. Değişik şekerler içeren besiyerlerinde kültürü yapılan mısır embriyolarının haftalık kök gelişmesi (mm).



Şekil 10. Değişik şekerler içeren besiyerlerinde kültürü yapılan mısır embriyolarının haftalık yaş ağırlık gelişmesi (mg).

kullanılarak, değişik şekerler içeren besiyerlerinde kültürü yapılan embriyolardan gelişen bitkicikler arasında yaş ağırlık verileri yönünden önemli farklar bulunmuştur. Yaş ağırlık değerleri yönünden de en yüksek sonuç sukroz, en düşük sonuç ise galaktozlu besiyerlerinden elde edilmiştir. Örneğin; 4. hafta deney tüplerinden elde edilen verilerde en yüksek ortalama yaş ağırlık 357.60 mg ile sukroz içeren besiyerlerinde, en düşük değer ise 108.8 mg ile galaktoz içeren besiyerinde bulunmuştur. Yaş ağırlık yönünden en yüksek verim sukrozlu besiyerinden sağlanmıştır. Bu be-

siyerini maltoz, glukoz ve fruktozlu besiyerleri izlemektedir. En düşük verim ise laktoz ve galaktozlu besiyerlerinden elde edilmiştir. Deney tüplerinde en yüksek yaş ağırlık gelişme hızı ilk hafta gerçekleşmekte ve zamanla kademeli olarak bir azalma görülmektedir (Şekil 10).

Değişik şekerler içeren besiyerlerinde kültürü yapılan mısır embriyolarında incelenen üç karaktere ait veriler arasında, sonuç itibarıyla büyük benzerlikler bulunmaktadır.

4.2. Çeşitli besiyeri faktörlerinin arpa embriyo kültürü üzerine etkisi :

4.2.1. pH etkisi ;

Farklı pH'lara sahip besiyerlerinde, deney tüpleri veya petri kutularında kültürü yapılan arpa embriyolarının haftalık kök boyları Tablo 8 a ve 9 a'da görülmektedir.

Haftalık kök boyları yönünden, her iki kültür kabından elde edilen veriler arasında büyük bir fark bulunmamaktadır. Petri kutularında büyütülen embriyoların haftalık kök boyları değerlendirildiğinde, farklı pH'larda kültürü yapılan embriyolar arasında önemli farklılıkların olduğu bulunmuştur. Ancak bu farklılıklar ilk üç hafta için geçerlidir. 4. hafta bu farklılıklar ortadan kalkmaktadır.

Tablo 8. Farklı pH'larda büyütilen arpa (*Hordeum vulgare* L.) embriyolarının haftalık ortalama;
a) Kök, b) Sürgün gelişimi, c) 28. gün sonunda bitki başına düşen ortalama yaş
ağırlık (Embriyolar 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık ortamda ve petrilerde büyütilmiştir).

a) Kök gelişimi (mm)

pH (% 4 sukroz)	1. Hafta (Ortalama ¹ ± S.H) ²	2. Hafta (Ortalama ¹ ± S.H)	3. Hafta (Ortalama ¹ ± S.H)	4. Hafta (Ortalama ¹ ± S.H)
5.2	13.44 ± 0.72 c ³	17.66 ± 0.08 ab	24.00 ± 1.15 b	32.88 ± 2.98 a
5.4	11.55 ± 1.36 bc	21.99 ± 2.98 b	26.60 ± 1.45 b	33.33 ± 1.76 a
5.6	14.55 ± 0.72 ab	24.44 ± 0.98 a	28.88 ± 0.67 ab	34.66 ± 0.88 a
5.8	15.55 ± 0.79 a	28.00 ± 4.58 a	34.22 ± 2.48 a	38.33 ± 2.17 a
6.0	13.66 ± 0.88 ab	25.22 ± 0.91 a	31.66 ± 1.45 a	36.00 ± 1.73 a
6.2	14.88 ± 1.45 a	25.55 ± 1.23 a	33.00 ± 1.52 a	35.33 ± 0.88 a
6.4	15.56 ± 0.88 a	27.00 ± 1.00 a	30.66 ± 2.33 ab	36.88 ± 0.95 a

b) Sürgün gelişimi (mm)

5.2	14.33 ± 0.88 b	26.22 ± 0.97 b	35.66 ± 0.88 d	48.55 ± 1.09 a
5.4	15.00 ± 1.52 b	30.00 ± 2.70 ab	38.00 ± 2.51 cd	50.66 ± 0.66 a
5.6	20.00 ± 1.54 a	33.55 ± 2.02 a	40.00 ± 2.51 bc	53.66 ± 4.33 a
5.8	20.55 ± 0.99 a	35.55 ± 0.79 a	43.33 ± 1.45 ab	54.88 ± 1.06 a
6.0	20.22 ± 2.01 a	35.00 ± 2.00 a	44.66 ± 1.45 a	54.00 ± 2.30 a
6.2	20.44 ± 0.77 a	35.33 ± 1.76 a	43.00 ± 2.08 ab	51.77 ± 1.05 a
6.4	21.10 ± 2.02 a	34.00 ± 2.64 a	42.00 ± 1.73 abc	51.66 ± 0.98 a

c) Yaş ağırlık (mg)

5.2	-	-	-	34.2 ± 1.82 c
5.4	-	-	-	37.2 ± 1.24 bc
5.6	-	-	-	45.2 ± 1.77 abc
5.8	-	-	-	54.8 ± 2.06 a
6.0	-	-	-	48.0 ± 1.41 ab
6.2	-	-	-	43.8 ± 2.51 abc
6.4	-	-	-	38.8 ± 2.51 bc

1 Her veri 3 tekrarın ortalamasıdır

2 Standart hata

3 Her şartında aynı harflerle belirtilen veriler 0.05 olasılık düzeyinde birbirinden farklı değildir. Farklı harflerle belirtilen veriler aynı olasılık düzeyinde birbirinden farklıdır.

Tablo 9. Farklı pH'larda büyütilen arpa (*Hordeum vulgare* L.) embriyolarının haftalık ortalama; a) Kök, b) Sürgün gelişimi, c) Bitki başına düşen ortalama yaş ağırlık (Embriyolar 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık ortamda ve tüplerde büyütilmiştir).

a) Kök gelişimi (mm)

pH	1. Hafta (Ortalama ¹ ± S.H) ²	2. Hafta (Ortalama ¹ ± S.H)	3. Hafta (Ortalama ¹ ± S.H)	4. Hafta (Ortalama ¹ ± S.H)
% 4 Sukroz				
4.6	13.40 ± 1.50 a ³	20.00 ± 1.06 a	29.40 ± 0.95 a	35.40 ± 1.80 a
5.2	14.60 ± 1.40 a	22.10 ± 1.72 a	31.00 ± 2.33 a	40.00 ± 2.25 a
5.8	16.30 ± 1.65 a	20.30 ± 1.05 a	31.10 ± 1.14 a	41.60 ± 2.25 a
6.4	16.90 ± 1.81 a	23.10 ± 1.74 a	31.90 ± 2.54 a	37.00 ± 2.21 a
7.0	16.60 ± 0.81 a	21.30 ± 1.62 a	30.30 ± 1.12 a	35.10 ± 1.30 a

b) Sürgün gelişimi (mm)

4.6	17.30 ± 2.08 a	33.70 ± 2.81 a	51.00 ± 2.91 a	67.00 ± 3.40 a
5.2	18.30 ± 2.76 a	36.00 ± 2.60 a	52.70 ± 2.94 a	71.10 ± 2.77 a
5.8	18.90 ± 2.49 a	36.90 ± 2.86 a	56.20 ± 2.35 a	72.60 ± 1.88 a
6.4	18.00 ± 1.55 a	35.40 ± 2.91 a	53.70 ± 2.26 a	66.50 ± 3.52 a
7.0	19.10 ± 2.27 a	31.10 ± 2.12 a	53.20 ± 3.42 a	69.20 ± 2.68 a

c) Yaş ağırlık (mg)

4.6	19.00 ± 1.48 a	35.30 ± 3.27 a	47.50 ± 2.17 a	53.00 ± 2.20 a
5.2	20.60 ± 1.62 a	37.40 ± 1.81 a	55.50 ± 3.96 a	58.40 ± 1.73 a
5.8	20.80 ± 2.02 a	38.70 ± 2.35 a	55.00 ± 2.25 a	60.00 ± 2.33 a
6.4	21.00 ± 2.29 a	37.70 ± 1.70 a	52.20 ± 1.38 a	57.40 ± 2.09 a
7.0	21.90 ± 1.92 a	37.10 ± 2.93 a	49.30 ± 2.03 a	55.60 ± 1.59 a

1 Her veri 10 tekrarın ortalamasıdır

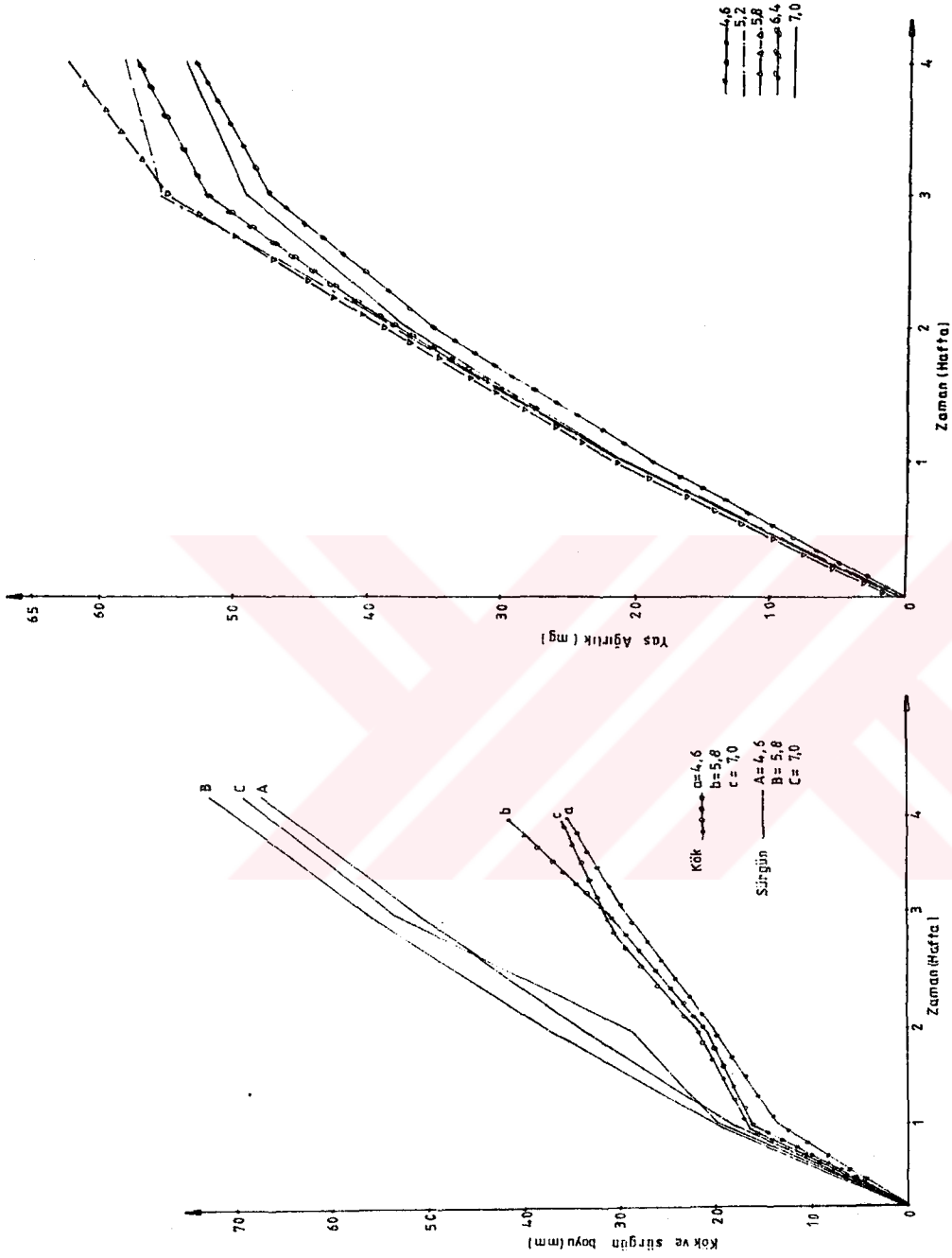
2 Standart hata

3 Her sütunda aynı harflerle gösterilen veriler 0.05 olasılık düzeyinde birbirinden farklı değildir. Farklı harflerle belirtilen veriler aynı olasılık düzeyinde birbirinden farklıdır.

Farklılığın ortaya çıktığı haftalarda en yüksek kök boyu $pH=5.8$ de, en düşük kök boyu ise $pH=5.2$ de gözlenmiştir. Diğer taraftan farklı pH 'larda ve deney tüplerinde kültürü yapılan embriyoların kök boyları arasında önemli bir farklılık görülmemiştir. Bu durum her hafta verileri için geçerlidir. Her iki kültür kabında da en yüksek kök gelişme hızı ilk hafta ortaya çıkmakta ve zamanla giderek azalmaktadır (Şekil 11).

Farklı pH 'larda kültürü yapılan arpa embriyolarının koleoptil boyları haftalık değerler halinde Tablo 8 b ve 9 b'de verilmektedir.

Deney tüplerinden elde edilen verilerin, petri kutularından elde edilen verilere göre daha yüksek değerlere sahip olduğu tablo sonuçlarında görülmektedir. Ayrıca deney tüplerinde ve farklı pH 'larda kültürü yapılan embriyoların kök boyları arasında önemli bir fark gözlenmemiş, buna karşılık petri kutularında kültürü yapılanlarda 2. ve 3. hafta değerleri açısından önemli farklılıklar bulunmuştur. Farklılıkların gözleendiği haftalarda en yüksek sürgün boyları 6.2 ve 6.0 olan pH değerlerinde, en düşük sürgün boyları ise 5.2 lik pH değerinde elde edilmiştir. Petri kutularında koleoptillerin gelişme hızı, ilk hafta



en yüksek düzeyde yer almakta ve haftalar ilerledikçe bu hızda giderek bir azalma söz konusu olmaktadır. Tüplerde ise gelişme hızı, haftalar arasında fark göstermeyecek şekilde ortaya çıkmaktadır (Şekil 11).

Arpa embriyolarından gelişen bitkiciklerin haftalık yaş ağırlık verileri Tablo 8 c ve 9 c'de görülmektedir.

Tablo verileri karşılaştırıldığında, deney tüplerinden elde edilen sonuçların, petri kutularından elde edilenlere göre daha yüksek değerler içerdiği görülmektedir. Ayrıca deney tüplerinden elde edilen veriler arasında, istatistiksel önemi olan herhangi bir farklılık bulunamamıştır (Tablo 9 c). Buna karşılık petri kutularından elde edilen 4. hafta verileri arasında önemli farklar bulunmuştur. Buradaki veriler içinde en yüksek yaş ağırlık değerini 5.8, en düşük yaş ağırlık değerini ise 5.2 lik pH içeren besiyerleri sağlamaktadır. Deney tüplerinden elde edilen yaş ağırlık verileri incelendiğinde, gelişme hızının ilk üç hafta aynı düzeyde kaldığı ve 4. haftada düşüş gösterdiği görülmektedir (Şekil 12).

Farklı pH'larda büyütülen arpa embriyolarında incelenen üç karakter arasında gelişmeleri yönünden bir paralellik göze çarpmaktadır.

4.2.2. Farklı sukroz konsantrasyonlarının etkisi :

Farklı sukroz konsantrasyonları içeren besiyerlerinde, deney tüpleri ve petri kutularında kültürü yapılan arpa embriyolarının haftalık kök boyları Tablo 10 a ve 11 a'da görülmektedir.

Tablolardaki veriler karşılaştırıldığında, her iki kültür kabından elde edilen sonuçlar arasında büyük bir fark bulunmadığı gözlenmektedir. Ayrıca her iki kültür kabında ve farklı sukroz konsantrasyonlarında büyütülen embriyolar arasında, haftalık kök boyları yönünden istatistiksel önemi olan farklılıklar bulunmuştur. Her iki kültür kabında da en yüksek kök boyları % 4 sukroz içeren besiyerlerinden elde edilmiştir. Buna karşılık en düşük kök boyları genellikle % 10 sukroz içeren besiyerlerinde gözlenmiştir. Petri kutuları ve deney tüplerinden elde edilen en yüksek kök gelişme hızı ilk hafta gerçekleşmiş ve zamanla bu hızda bir azalmanın olduğu gözlenmiştir (Şekil 13).

Aynı koşullarda arpa embriyolarının haftalık sürgün boylarına ilişkin veriler Tablo 10 b ve 11 b'de görülmektedir. Bu veriler karşılaştırıldığında, deney tüplerinden elde edilen sonuçların biraz daha yüksek değerler içerdiği görülmektedir. Bununla beraber deney tüplerinde

Tablo 10. Farklı sukroz konsantrasyonlarında büyütülen arpa (*Hordeum vulgare* L.) embriyolarının haftalık ortalama; a) Kök, b) Sürgeün gelişimi, c) 28. gün sonunda bitki başına düşen ortalama yaş ağırlık (Embriyolar 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık ortamda ve petrilere büyütülmüştür).

a) Kök gelişimi (mm)

% Sukroz (μ H=5.8)	1. Hafta (Ortalama ¹ $\pm$ S.H) ²	2. Hafta (Ortalama ¹ $\pm$ S.H)	3. Hafta (Ortalama ¹ $\pm$ S.H)	4. Hafta (Ortalama ¹ $\pm$ S.H)
% 2	11.66 $\pm$ 1.66 bc ³	21.00 $\pm$ 1.73 ab	29.55 $\pm$ 1.36 ab	31.99 $\pm$ 1.01 b
% 4	15.55 $\pm$ 0.79 a	28.00 $\pm$ 4.58 a	34.22 $\pm$ 2.48 a	38.33 $\pm$ 0.88 a
% 6	13.66 $\pm$ 0.88 ab	18.33 $\pm$ 0.66 b	25.44 $\pm$ 1.23 bc	27.88 $\pm$ 1.57 bc
% 8	11.00 $\pm$ 0.57 bc	18.00 $\pm$ 1.52 b	22.10 $\pm$ 1.44 b	26.33 $\pm$ 1.45 c
% 10	10.00 $\pm$ 2.75 c	14.66 $\pm$ 0.66 b	21.00 $\pm$ 2.64 c	24.66 $\pm$ 0.88 c

b) Sürgeün gelişimi (mm)

% 2	19.66 $\pm$ 0.84 a	29.66 $\pm$ 7.93 ab	35.77 $\pm$ 1.16 b	44.55 $\pm$ 2.25 b
% 4	20.55 $\pm$ 0.99 a	33.55 $\pm$ 0.79 a	43.33 $\pm$ 1.45 a	54.88 $\pm$ 1.06 a
% 6	15.00 $\pm$ 2.88 a	31.66 $\pm$ 4.48 ab	35.88 $\pm$ 1.06 b	41.66 $\pm$ 2.33 bc
% 8	15.00 $\pm$ 1.52 a	21.33 $\pm$ 1.85 bc	29.55 $\pm$ 1.65 c	37.55 $\pm$ 1.23 cd
% 10	10.33 $\pm$ 0.33 b	19.00 $\pm$ 0.57 c	26.99 $\pm$ 1.34 c	33.99 $\pm$ 1.71 d

c) Yaş ağırlık (mg)

% 2	-	-	-	41.4 $\pm$ 1.86 b
% 4	-	-	-	54.8 $\pm$ 2.05 a
% 6	-	-	-	35.0 $\pm$ 2.30 c
% 8	-	-	-	32.8 $\pm$ 1.65 c
% 10	-	-	-	30.6 $\pm$ 1.40 c

1 Her veri 3 tekrarın ortalamasıdır

2 Standart Hata

3 Her sütunda aynı harflerle belirtilen veriler 0.05 olasılık düzeyinde birbirinden farklı değildir. Farklı harflerle belirtilen veriler aynı olasılık düzeyinde birbirinden farklıdır.

Tablo 11. Farklı sukroz konsantrasyonlarında büyütilen arpa (*Hordeum vulgare* L.) embriyolarının haftalık ortalama; a) Kök, b) Sürgün gelişimi, c) Bitki başına düşen ortalama yaş ağırlık (Embriyolar 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık ortamda ve tıplarda büyütilmiştir).

a) Kök gelişimi (mm)

% Sukroz (pH.5.8)	1. Hafta (Ortalama ¹ ± S.H) ²	2. Hafta (Ortalama ¹ ± S.H)	3. Hafta (Ortalama ¹ ± S.H)	4. Hafta (Ortalama ¹ ± S.H)
% 2	11.70 ± 0.77 b ³	19.10 ± 0.80 ab	26.40 ± 1.04 b	31.00 ± 1.02 b
% 4	10.30 ± 1.65 a	20.50 ± 1.06 a	31.30 ± 1.14 a	41.60 ± 2.25 a
% 6	10.90 ± 0.85 b	18.30 ± 0.86 abc	24.40 ± 0.94 bc	27.60 ± 0.99 bc
% 8	12.60 ± 0.73 b	16.70 ± 0.73 bc	22.60 ± 0.60 cd	26.10 ± 0.98 c
% 10	11.70 ± 1.31 b	15.70 ± 0.65 c	21.50 ± 0.62 b	26.00 ± 0.96 c

b) Sürgün gelişimi (mm)

% 2	12.10 ± 1.34 a	27.50 ± 1.47 b	50.10 ± 2.04 b	62.40 ± 1.33 b
% 4	18.90 ± 2.49 a	36.90 ± 2.86 a	56.20 ± 2.35 a	72.60 ± 1.98 a
% 6	17.00 ± 2.29 a	28.00 ± 1.95 b	45.80 ± 0.97 b	58.00 ± 2.00 bc
% 8	16.40 ± 2.45 a	26.20 ± 1.17 b	40.60 ± 1.05 c	57.80 ± 1.79 bc
% 10	13.30 ± 1.75 a	25.70 ± 0.97 b	39.70 ± 0.87 c	52.50 ± 2.26 c

c) Yaş ağırlık (mg)

% 2	14.40 ± 0.97 a	29.00 ± 1.37 b	39.70 ± 0.68 b	45.60 ± 1.36 b
% 4	20.00 ± 2.02 a	38.70 ± 1.81 a	55.00 ± 2.25 a	60.00 ± 3.33 a
% 6	17.30 ± 1.10 a	29.40 ± 1.48 b	38.50 ± 1.13 b	44.10 ± 1.65 b
% 8	17.50 ± 1.27 a	27.10 ± 1.21 b	36.20 ± 0.99 bc	40.00 ± 3.47 b
% 10	15.90 ± 3.78 a	26.60 ± 1.64 b	34.30 ± 0.60 c	39.00 ± 0.83 b

1 Her veri 10 tekrarın ortalamasıdır

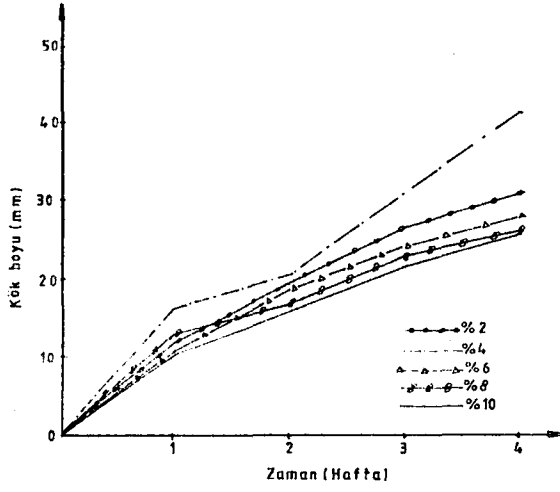
2 Standart hata

3 Her sütunda aynı harflerle gösterilen veriler 0.05 olasılık düzeyinde birbirinden farklı değildir. Farklı harflerle belirtilen veriler aynı olasılık düzeyinde birbirinden farklıdır.

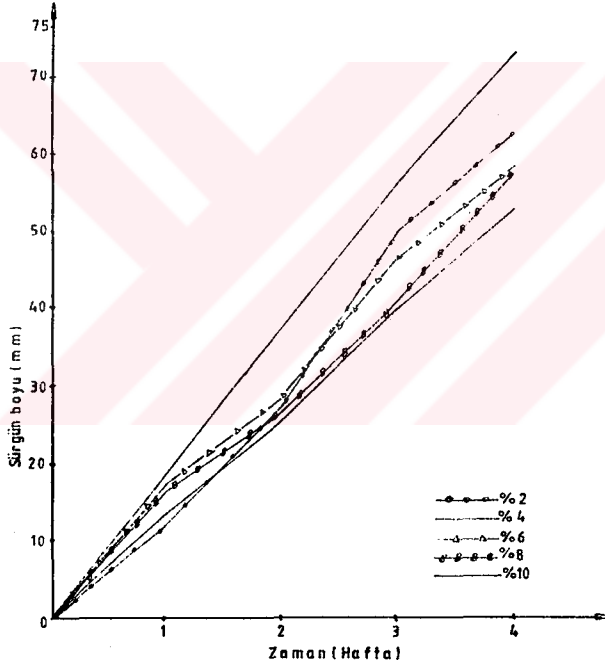
yapılan çalışmalarda, besiyerleri arasında ilk hafta farklılık gözlenmemiş, diğer haftalarda ise istatistiksel öneme sahip farklılıklar bulunmuştur. Petri kutuları için bu farklılıklar her hafta ortaya çıkmıştır. Her iki kültür kabında en yüksek sürgün boyu % 4, en düşük sürgün boyu ise % 10 sukroz içeren besiyerlerindeki embriyolarda gözlenmiştir. Petri kutularında en yüksek sürgün gelişme hızı ilk hafta görülmekte ve zamanla bu hızda bir azalma görülmektedir. Deney tüplerinde ise gelişme hızı açısından haftalar arasında farklılık görülmemektedir (Şekil 14).

Farklı sukroz konsantrasyonları içeren besiyerlerinde kültürü yapılan embriyoların geliştirdiği bitkiciklere ait yaş ağırlık verileri Tablo 10 c ve 11 c'de görülmektedir.

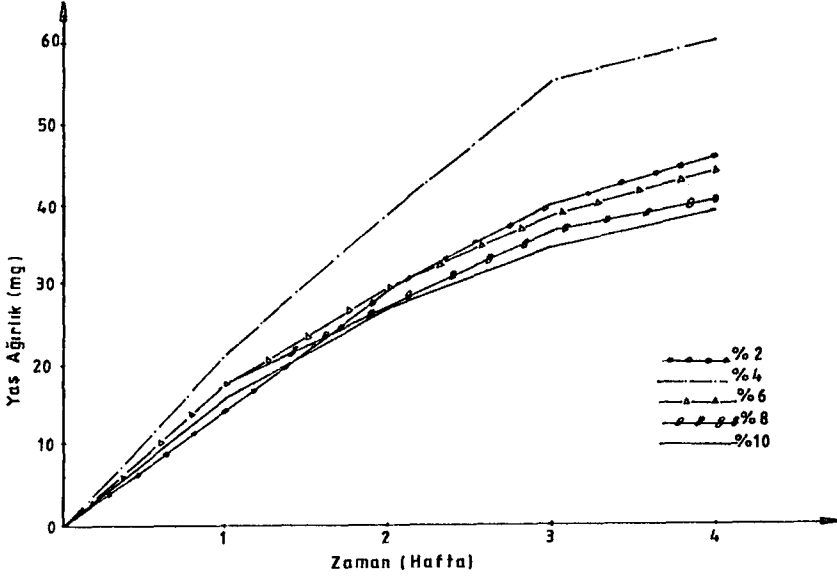
Son hafta değerleri itibarıyla, deney tüplerinden elde edilen sonuçların biraz daha yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca her iki kültür kabında da farklı sukroz konsantrasyonları içeren besiyerlerinde gelişen bitkiciklere ait yaş ağırlık verileri arasında önemli farklar bulunmuştur. Bu farklılık % 4 lük sukroz konsantrasyonu ile diğer konsantrasyonlarda büyütülen embriyolar arasında gözlenmiştir. Arpa embriyolarından gelişen bitkiciklerde de en



Şekil 13. Farklı sukroz konsantrasyonlarında kültürlü yapılan arpa embriyolarının haftalık kök gelişmesi (mm).



Şekil 14. Farklı sukroz konsantrasyonlarında kültürlü yapılan arpa embriyolarının haftalık sürgün gelişmesi (mm).



Şekil 15. Farklı sukroz konsantrasyonlarında kültürlü yapılan arpa embriyolarının haftalık yaş ağırlık gelişmesi (mg).

yüksek yaş ağırlık verileri % 4 lük sukroz konsantrasyonu içeren besiyerlerinden elde edilmiştir. En düşük yaş ağırlık verileri ise % 10 luk sukroz konsantrasyonu içeren besiyerlerinden elde edilmiştir. Bu durum her iki kültür kabı için geçerlidir. Deney tüplerinden elde edilen yaş ağırlık verileri incelendiğinde en yüksek gelişmenin ilk hafta meydana geldiği ve diğer haftalarda giderek azalma gösterdiği saptanmıştır.

Farklı sukroz konsantrasyonlarında kültürlü yapılan arpa embriyolarında kök, sürgün ve yaş ağırlık değerleri yönünden benzer sonuçlar elde edilmiştir.

4.2.3. Değişik şekerlerin etkisi :

Karbon kaynağı olarak değişik şekerlerin kullanıldığı besiyerlerinde kültürü yapılan arpa embriyolarının haftalık kök boyları Tablo 12 a ve 13 a'da görülmektedir.

Tablolardaki değerler karşılaştırıldığında, her iki kültür kabından elde edilen sonuçların benzerlik gösterdiği ortaya çıkmaktadır. Her iki kültür kabında da, değişik şekerler içeren besiyerlerinde kültürü yapılan arpa embriyoları arasında kök boyları yönünden önemli farklılıklar bulunmuştur. Bu farklılıklar her hafta için geçerlidir. Haftalık kök boyları açısından en yüksek sonuçlar sukroz, en düşük sonuçlar ise galaktoz içeren besiyerlerinde kültürü yapılan embriyolardan elde edilmiştir. Sukrozdan sonra en iyi verim maltoz içeren besiyerinden elde edilmiştir. Deney tüplerinden elde edilen 4. hafta verilerinde en yüksek sonuç 41.60 mm ile sukroz, en düşük sonuç ise 3.80 mm ile galaktoz içeren besiyerlerinde bulunmaktadır. Maltoz içeren besiyerlerinde ise bu değer 31.70 mm dir. Tablo 13 a'daki veriler incelendiğinde, arpa embriyolarının en yüksek kök gelişmesinin sukroz ve maltoz içeren besiyerlerinde gerçekleştiği görülmektedir. Glukoz ve fruktozlu besiyerlerinin orta derecede, laktoz ve galaktozlu besiyer-

Tablo 12. Farklı şeker içeren besiyerlerinde büyütülen arpa (*Hordeum vulgare* L.) embriyolarının haftalık ortalama; a) Kök, b) Sürгүн gelişimi, c) 28. gün sonunda bitki başına düşen ortalama yaş ağırlık (Embriyolar 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık ortamda ve petri-lerde büyütülmüştür).

a) Kök gelişimi (mm)

Farklı Şeker (% 4, pH=5.8)	1. Hafta (Ortalama ¹ ± S.H) ²	2. Hafta (Ortalama ¹ ± S.H)	3. Hafta (Ortalama ¹ ± S.H)	4. Hafta (Ortalama ¹ ± S.H)
Sukroz	15.55 ± 0.79 a ³	28.00 ± 4.58 ab	34.22 ± 2.48 a	38.33 ± 2.18 a
Maltoz	16.33 ± 3.38 a	32.33 ± 1.76 a	37.11 ± 1.60 a	40.22 ± 1.47 a
Glukoz	13.88 ± 1.49 ab	22.00 ± 2.70 bc	25.44 ± 2.32 b	26.22 ± 1.12 b
Fruktoz	14.33 ± 0.88 ab	20.66 ± 1.45 bc	24.33 ± 1.20 b	24.77 ± 0.62 b
Laktoz	11.10 ± 1.09 b	16.22 ± 2.61 c	17.44 ± 0.98 c	18.22 ± 0.49 c
Galaktoz	2.00 ± 0.00 c	8.66 ± 1.45 d	10.22 ± 0.76 d	10.55 ± 0.86 d

b) Sürгүн gelişimi (mm)

Sukroz	20.55 ± 0.99 a	33.55 ± 0.79 a	43.33 ± 1.45 a	54.88 ± 1.06 a
Maltoz	17.55 ± 1.85 a	34.44 ± 5.57 a	38.88 ± 2.98 a	42.44 ± 1.39 b
Glukoz	12.00 ± 1.52 b	28.33 ± 3.18 ab	31.55 ± 0.86 b	35.00 ± 2.64 c
Fruktoz	10.66 ± 1.33 b	21.00 ± 1.52 b	25.55 ± 1.75 bc	29.55 ± 2.52 cd
Laktoz	9.33 ± 1.85 b	20.33 ± 2.33 b	21.33 ± 2.40 c	25.66 ± 2.40 d
Galaktoz	4.66 ± 0.33 c	8.55 ± 0.29 c	9.66 ± 0.33 d	10.33 ± 1.17 e

c) Yaş ağırlık (mg)

Sukroz	-	-	-	54.8 ± 2.05 a
Maltoz	-	-	-	39.2 ± 2.76 b
Glukoz	-	-	-	27.4 ± 4.25 c
Fruktoz	-	-	-	25.4 ± 2.20 c
Laktoz	-	-	-	21.6 ± 1.63 c
Galaktoz	-	-	-	12.4 ± 1.56 d

1 Her veri 3 tekrarın ortalamasıdır

2 Standart hata

3 Her sütunda aynı harflerle belirtilen veriler 0.05 olasılık düzeyinde birbirinden farklı değildir. Farklı harflerle belirtilen veriler aynı olasılık düzeyinde birbirinden farklıdır.

Tablo 13. Farklı şeker içeren besiyerlerinde büyütülen arpa (*Hordeum vulgare* L.) embriyolarının haftalık ortalama; a) Kök, b) Sürgün gelişimi, c) Bitki başına düşen ortalama yaş ağırlık (Embriyolar 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık ortamda ve tüplerde büyütülmüştür).

a) Kök gelişimi (mm)

Farklı Şeker (% 4, pH=5.8)	1. Hafta (Ortalama ¹ ± S.H) ²	2. Hafta (Ortalama ¹ ± S.H)	3. Hafta (Ortalama ¹ ± S.H)	4. Hafta (Ortalama ¹ ± S.H)
Sukroz	16.30 ± 1.65 a ³	20.50 ± 1.06 a	31.30 ± 1.14 a	41.60 ± 2.25 a
Maltoz	11.40 ± 0.76 b	15.30 ± 1.29 b	25.00 ± 0.57 b	31.70 ± 1.39 b
Glukoz	5.60 ± 0.52 c	10.10 ± 0.82 c	15.00 ± 0.68 c	18.00 ± 1.44 c
Fruktoz	4.60 ± 0.42 c	9.30 ± 0.63 c	12.90 ± 0.64 c	17.20 ± 0.81 c
Laktoz	1.80 ± 0.25 d	2.30 ± 0.53 d	6.50 ± 0.52 d	8.00 ± 0.80 d
Galaktoz	0.40 ± 0.16 d	1.50 ± 0.13 d	2.10 ± 0.23 e	3.60 ± 0.55 d

b) Sürgün gelişimi (mm)

Sukroz	18.90 ± 2.49 a	36.90 ± 2.86 a	56.20 ± 2.35 a	72.60 ± 1.88 a
Maltoz	11.20 ± 1.05 b	29.80 ± 1.74 b	45.60 ± 1.72 b	59.70 ± 5.59 b
Glukoz	4.90 ± 0.43 c	11.20 ± 0.75 c	24.60 ± 1.46 c	34.90 ± 1.99 c
Fruktoz	3.20 ± 0.20 cd	10.70 ± 1.02 c	23.90 ± 1.72 c	32.70 ± 1.17 c
Laktoz	0.90 ± 0.23 d	4.60 ± 0.56 d	8.40 ± 0.49 d	10.00 ± 0.76 d
Galaktoz	0.50 ± 0.15 d	1.50 ± 0.16 d	4.00 ± 0.21 d	6.10 ± 0.50 d

c) Yaş ağırlık (mg)

Sukroz	20.80 ± 2.02 a	33.70 ± 2.35 a	55.00 ± 2.25 a	60.00 ± 3.33 a
Maltoz	14.70 ± 1.20 b	31.50 ± 2.39 b	41.90 ± 1.85 b	49.60 ± 2.01 b
Glukoz	9.30 ± 0.70 c	14.10 ± 0.76 c	22.10 ± 1.03 c	26.80 ± 0.90 c
Fruktoz	7.80 ± 0.57 c	12.80 ± 0.66 c	20.90 ± 0.88 c	24.00 ± 1.17 c
Laktoz	4.00 ± 0.11 d	7.30 ± 0.39 d	10.00 ± 0.81 d	13.50 ± 0.82 d
Galaktoz	3.30 ± 0.21 d	5.60 ± 0.40 d	6.00 ± 0.49 d	10.00 ± 0.59 d

1 Her veri 10 tekrarın ortalamasıdır

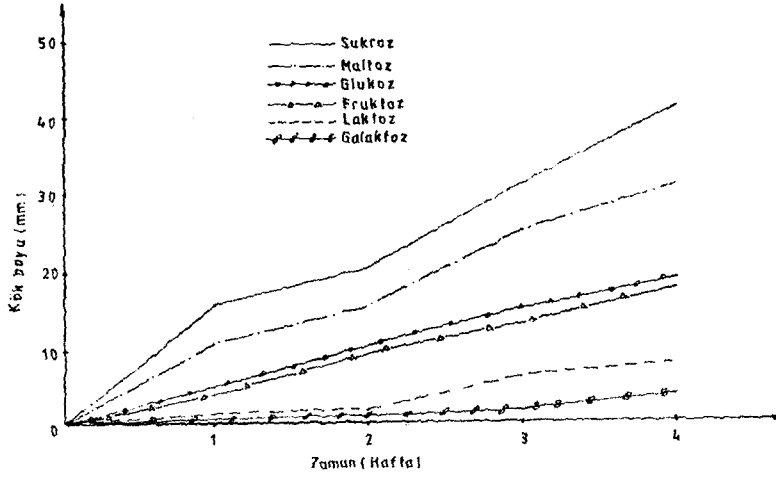
2 Standart hata

3 Her sütunda aynı harflerle belirtilen veriler 0.05 olasılık düzeyinde birbirinden farklı değildir. Farklı harflerle belirtilen veriler aynı olasılık düzeyinde birbirinden farklıdır.

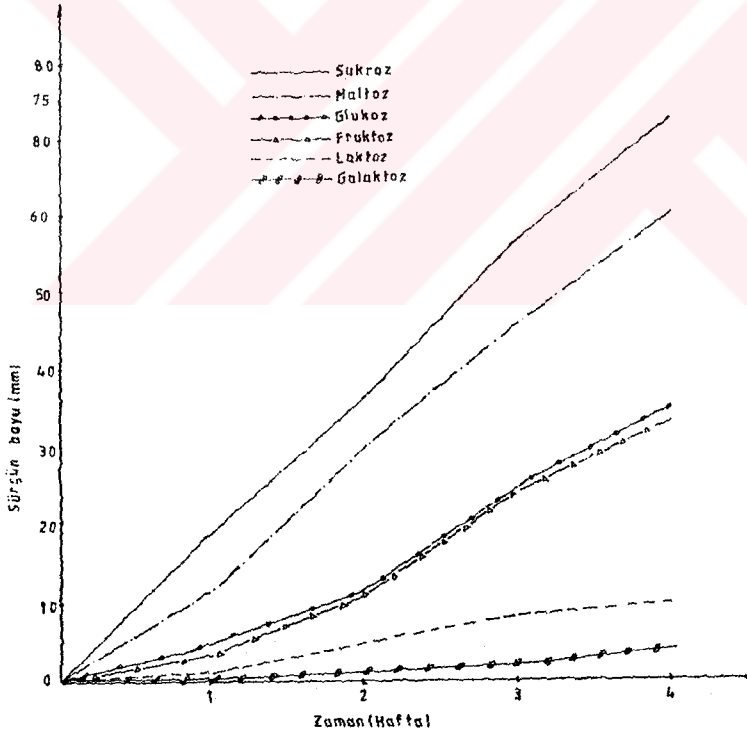
lerinin ise zayıf derecede etkili oldukları gözlenmiştir. Gerek deney tüplerinde, gerekse petri kutularında en yüksek gelişme hızı ilk haftalarda gerçekleşmekte, daha sonra bu hızda kademeli olarak bir azalma görülmektedir (Şekil 16).

Aynı koşullar altında kültürü yapılan arpa embriyolarının haftalık sürgün boylarına ilişkin veriler Tablo 12 b ve 13 b'de görülmektedir.

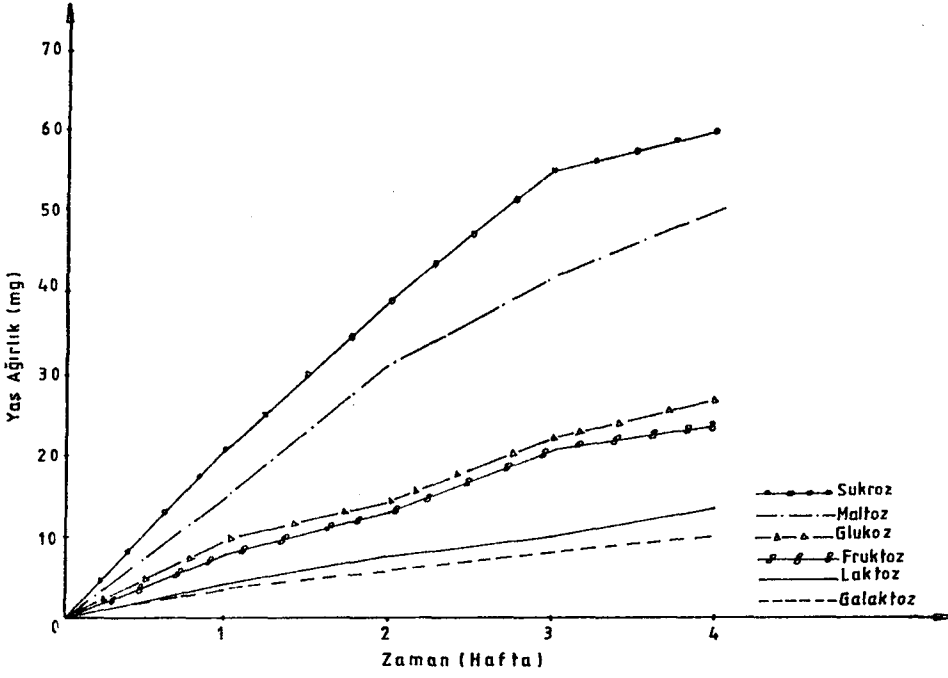
Her iki kültür kabından elde edilen haftalık sürgün değerleri arasında genellikle önemli bir fark bulunmamaktadır. Bununla beraber sukroz, maltoz, glukoz ve fruktozlu besiyerlerinden elde edilen veriler açısından petri kutuları biraz daha yüksek değerler içermektedir. Ancak, elde edilen bulgular yönünden her iki kültür kabı arasında bir fark yoktur. En yüksek sürgün boyu, her hafta sukroz içeren besiyerlerinde, en düşük sürgün boyu ise galaktoz içeren besiyerlerinde kültürü yapılan embriyolardan elde edilmiştir. Örneğin; 4. haftada deney tüplerinden elde edilen verilerde en yüksek sürgün boyu (ortalama) 72.60 mm ile sukroz içeren besiyerlerinde, en düşük sürgün boyu ise (ortalama) 6.10 mm ile galaktoz içeren besiyerlerinde kültürü yapılan arpa embriyolarında yer



Şekil 16. Değişik şekerler içeren besiyerlerinde kültürü yapılan arpa embriyolarının haftalık kök gelişmesi (mm).



Şekil 17. Değişik şekerler içeren besiyerlerinde kültürü yapılan arpa embriyolarının haftalık sürgün gelişmesi (mm).



Şekil 18. Değişik şekerler içeren besiyerlerinde kültürü yapılan arpa embriyolarının haftalık yaş ağırlık gelişmesi (mg).

almaktadır (Tablo 13 b). Sukrozlu besiyerinden sonra en iyi sürgün gelişmesi maltozlu besiyerinde görülmektedir. sürgün gelişmesi glukoz ve fruktozlu besiyerlerinde vasat, laktoz ve galaktozlu besiyerlerinde ise zayıf bir şekilde gerçekleşmektedir. Arpa embriyolarında sürgün gelişme hızı genellikle haftalar arasında fark göstermeyecek şekilde ortaya çıkmaktadır (Şekil 17).

Değişik şekerler içeren besiyerlerinde kültürü yapılan arpa embriyolarından gelişen bitkiciklerin, haftalık yaş ağırlık verileri Tablo 12 c ve 13 c'de görülmektedir. Yaş ağırlık yönünden iki kültür kabından elde edilen veriler arasında fark bulunmamaktadır. Ayrıca petri

kutuları ve deney tüplerinden benzer bulgular elde edilmiştir. Yine bu iki kültür kabında ve değişik şekerler içeren besiyerlerinde gelişen bitkicikler arasında önemli farkla mevcuttur. Yaş ağırlık değerleri yönünden en yüksek sonuç sukroz, en düşük sonuç ise galaktoz içeren besiyerlerinde gelişen bitkiciklerden elde edilmiştir. Örneğin bu durum deney tüplerinden elde edilen 4. hafta verilerinde görülmektedir. Burada en yüksek ortalama yaş ağırlık değeri 60.00 mg ile sukrozlu besiyerinden, en düşük ise 10.00 mg ile galaktozlu besiyerinden elde edilmiştir. Yaş ağırlık yönünden maltoz içeren besiyerleri de oldukça etkili olmaktadır. Glukoz ve fruktozlu besiyerlerinde ise yaş ağırlık yönünden gelişme vasat düzeyde kalmaktadır. Diğer taraftan, en düşük verim laktoz ve galaktozlu besiyerlerinden elde edilmiştir. Deney tüplerinde en yüksek yaş ağırlık gelişme hızı ilk haftada gerçekleşmekte ve zamanla giderek azalmaktadır (Şekil 18).

Değişik şekerler içeren besiyerlerinde kültürü yapılan arpa embriyolarının kök, sürgün ve yaş ağırlık verileri arasında sonuç itibarıyla büyük benzerlikler vardır.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada olgunlaşmış arpa ve mısır embriyolarının in vitro kültüründe; kök, sürgün gelişimi ve yaş ağırlık üzerine pH, şeker konsantrasyonları ve farklı şeker tiplerinin etkileri araştırılmıştır. Tablolar, mısır embriyolarından elde edilen değerlerin arpaya göre daha yüksek olduğunu göstermektedir (Tablo 2-13). Mısır embriyolarının arpa embriyolarına daha büyük olmasının yanı sıra, mısır bitkisinin kendisi de arpa bitkisinden büyüktür. Bu özellik embriyoların gelişmelerindeki farklılıkta da görülmektedir.

Öte yandan WENT (1952)'e göre; bitki embriyolarında sentezlenen, gelişmeleri için gerekli olan büyüme faktörleri difüzyon yoluyla besiyerine geçmektedir. Büyük embriyolarda yeterli miktarda sentezlenen bu maddeler gelişme başlangıcında toplanmakta iken, daha küçük olanlar da besiyerine difüze olmaktadır. Bu durum bazı büyüme faktörlerinin eklenmediği besiyerlerinde neden büyük bitki embriyolarının daha iyi büyüdüğü sorusuna yanıt verebilir (RAPPA-PORT, 1954).

Arpa embriyolarının in vitro kültüründen elde edilen kök, sürgün boyu ve yaş ağırlık değerlerindeki varyans,

mısır bitkisinden elde edilenlere göre daha homojendir. Arpa kendine döllek (autogam) bir bitki olduğundan genetik olarak homozigottur. Bu nedenle embriyolar arasında genetik farklılık yoktur ve daha homojen bir büyüme gösterirler. Mısır ise yabancı döllek (allogam) bir bitkidir, dolayısı ile heterozigoti oranı yüksektir ve bitki embriyoları arasında genetik farklılıklar bulunabilir. Ayrıca aynı büyüklükte kültüre alınmasına gayret edilmesine rağmen, başlangıç embriyolarının büyüklük farklılığı da daha sonraki gelişmeye etki edebilir.

Çeşitli besiyeri faktörlerinin denendiği bu çalışmada, her iki bitki türüne ait embriyolardan benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu durum her iki bitki embriyolarında gözlenen gelişmelerin, çeşitli besiyeri faktörlerinden aynı şekilde etkilendiğini göstermektedir. Tüm bunlara karşın LAZAR ve ark. (1983), olgunlaşmış buğday embriyolarının kültürlerinde, yaş ağırlık artışının değişik buğday çeşitlerinde farklılık gösterdiğini, bunun üzerine kültür ortamının daha etkili olabileceğini belirtmişlerdir. Aynı şekilde arpa embriyo kültürlerinde gelişme ve kallus oluşumunun çeşide ve besin ortamına bağlı olduğu rapor edilmiştir (THOMAS ve SCOTT, 1985).

In vitro şartlarda kültürü yapılan arpa ve mısır embriyolarının gelişmeleri üzerine farklı pH değerlerine sahip besiyerlerinin önemli bir etkisi gözlenememiştir. Özellikle deney tüplerinden elde edilen sonuçlar bunu açıkça kanıtlamaktadır (Tablo 3 ve Tablo 9). Petri kutularından elde edilen sonuçlar da ise kök ve sürgün boyları açısından ilk üç hafta bakımından farklılıklar bulunmuş, ancak 4. hafta bu farklılıklar ortadan kalkmıştır. Yaş ağırlık değerlerinin elde edildiği 4. hafta sonuçları arasında da farklılıklar bulunmuştur (Tablo 2 ve Tablo 8). Ancak elde edilen bu sonuçlar, pH etkisinden çok, kullanılan kültür kabı yada haftalık ölçümlerden elde edilen verilerin değerlendirilmesinden dolayı ortaya çıkmaktadır. Zira petri kutuları yüzey olarak daha geniştir. Bu durumda embriyolar köklerini(zellikle yan köklerini) daha geniş alana geliştirebilirler. Böylelikle embriyoların gerekli maddeleri elde etmek için besiyerine uzattıkları yan kökler aynı zamanda besiyerindeki maddelerin hızla tüketilmesine neden olabilmektedir. Nitekim petri kutularından elde edilen veriler bu yüzeyden ilk hafta en yüksek düzeyde iken, haftalar ilerledikçe hızlı bir düşüşe geçmektedir. Ayrıca sürgünlerde de yerçekimine negatif yönde gelişmeleri petri kutularında

söz konusu olmamaktadır. Deney tüplerinde yer alan besiyerleri miktar açısından hemen hemen eşittir. Ayrıca deney tüplerinde kültürü yapılan embriyoların sayısı da azdır. Son olarak sürgün gelişimine olumsuz etki yapacak şartlar da yoktur. Yani yer çekimine negatif doğrultuda sürgün gelişimi deney tüplerinde daha elverişli olmaktadır.

Farklı pH değerlerine sahip besiyerlerinde büyütülen embriyolar arasında herhangi bir fark gözlenememiş olması, bu konuda yapılan diğer araştırma sonuçlarına paralellik göstermektedir (Van OVERBEEK, 1944; RIJVEN, 1952). Nitekim bitki doku kültürlerinde besin ortamının pH'sının mikroorganizma ve hayvan hücre kültürlerinde olduğu gibi kesin bir değere ayarlamaya genellikle gerek yoktur. Optimal pH değeri genellikle bitki türü ve doku tipine bağlıdır. Bitki doku kültürleri için hazırlanan çözeltiler hafif asidik olduğundan, optimal bölgede bulunmaktadır. Bunun yanında doku, pH değerinin gelişmesi ile birlikte uygun sahaya getirme yeteneğindedir (KOBLOITZ, 1972). Bununla beraber başarılı bir embriyo kültürü için besiyeri pH'sının iyi bilinmesi ve pH ayarlamasının titiz bir şekilde yapılması gerekmektedir (BUTCHER ve INGRAM, 1976; REINERT ve YEOMAN, 1982). Buna karşılık bitki embriyolarının yaşı,

boyutu ve bitki türüne bağlı olarak optimum besiyeri pH'ının değiştiği, ayrıca yine ayrı özelliklerinden dolayı embriyoların pH faktöründen farklı şekilde etkilendiği ortaya çıkmaktadır. Nitekim bu çalışmanın sonuçları, olgunlaşmış arpa ve mısır embriyolarının pH faktöründen fazla etkilenmediğini ve 4.6 - 7.0 arasında değişen pH aralığında kültürleri yapılabileceğini göstermektedir. Ancak bu pH değerleri içinde en istikrarlı sonuçlar 5.6 ile 5.8 lik pH değerlerinden elde edilmektedir. Bu durum arpa ve mısır embriyolarının kültürü için verilen pH değerlerine paralellik göstermektedir (ZIEBUR ve BRINK, 1947, 1950, 1951; REINERT ve YEOMAN, 1982).

Mısır ve arpa embriyolarının gelişmesi pH değeri 7.0'ye yaklaştıkça ve kültür süresi uzadıkça yavaşlamaktadır. Bu kayma istatistikî açıdan önemli olmamasına rağmen, daha ziyade demir alınımında bir eksikliğe dayandırılabilir. Çünkü pH'nın yükselmesi demir ve diğer metal iyonlarının alınmasını güçleştirmektedir (KOBLOITZ 1972; STREET, 1973). Besin ortamına Fe - EDTA'nın (demirli etilendiamin tetra asetik asit'in) eklenmesi, demirin ve diğer metallerin geniş bir pH aralığında alınmasını hızlandırmaktadır (FERGUSON ve arkadaşları 1958; KLEIN ve MANOS, 1960;

STREET, 1973). Çalışmada kullandığımız besin ortamında Fe - EDTA bulunmadığı için, yüksek pH'lara demir ve diğer metal iyonlarının alınımında bir engel oluşabileceğinden, burada olumsuz bir etkiden bahsedilebilir.

Farklı sukroz konsantrasyonları içeren besiyerlerinde kültürü yapılan mısır ve arpa embriyolarında incelenen üç karakter bakımından önemli farklılıklar bulunmuştur. Genellikle düşük sukroz konsantrasyonlarında büyütülen embriyolarda kök, sürgün ve yaş ağırlık yönünden gelişmeleri nispeten daha yüksek olmaktadır. Sukroz konsantrasyonu arttıkça, embriyoların kök, sürgün ve yaş ağırlıklarında gelişme hızları giderek yavaşlamaktadır. Gerek deney tüpleri, gerekse petri kutularında aynı sonuçlar elde edilmiştir. Öte yandan aynı koşullarda büyütülen arpa embriyolarına ait değerlerde bu durum daha belirgin şekilde ortaya çıkmaktadır.

Kültür ortamında yer alan karbohidratların oynadığı en önemli rollerden biri, embriyoda çeşitli yaşam işlevlerinin sürdürülmesi için gerekli enerji kaynağının sağlanmasıdır. İkinci önemli rolleri ise kültür ortamında osmotik basınç oluşturmalarıdır (RAPPAPORT, 1954; RAGHAVAN, 1966). Farklı sukroz konsantrasyonlarında kültürü yapılan

çeşitli bitki embriyolarının yaş, boyut ve bitki türüne göre değişen gelişmeler gösterdiği gözlenmiştir (RAPPAPORT, 1954). Genellikle çoğu bitki dokusu için % 2-5 sukroz en iyi karbon kaynağı olmaktadır (KOBLITZ, 1972).

Olgunlaşmamış arpa embriyolarının gelişimi için kullanılan değişik sukroz konsantrasyonlarında % 12.5 lik şekerde embriyo gelişimi gerçekleşmesine rağmen, en iyi çimlenme % 2 lik şeker konsantrasyonunda bulunmuştur (ZIEBUR ve BRINK, 1951). Olgunlaşmamış pirinç karyopsisleri kültüründe embriyo gelişmesi için % 3 lük sukroz konsantrasyonunun % 8 e göre daha iyi olduğu bulunmuştur. Fakat arpada her iki şeker konsantrasyonu açısından bir fark saptanamamıştır (NAGATO, 1979). Ortamın osmotik konsantrasyonundaki artış, muhtemelen bitki embriyosunda su ekonomisine olumsuz bir etkiye bulunduğu düşünülebilir.

Karbon kaynağı olarak değişik şekerleri içeren besiyerlerinde kültürü yapılan mısır ve arpa embriyolarında kök, sürgün ve yaş ağırlık değerleri arasında önemli farklılıklar gözlenmiştir. Bu durum çalışmada kullanılan her iki kültür kabı ve tüm haftalar için geçerlidir. Arpa ve mısır embriyolarında haftalık gelişimleri incelenen üç karakterde de en iyi sonuçlar sukroz içeren besiyerlerin-

den elde edilmiştir. Bu durum bitki embriyo kültürlerinde, sukrozun diğer mono ve disakkaritlere göre üstünlüğü olan bir karbon kaynağı olduğunu öne süren araştırmalara paralellik göstermektedir (WHITE, 1934, 1940; Van OVERBEEK et. al. 1944). Bitki dokularının değişik şekerleri kullanma yeteneği, doku tipi ve bitki türüne bağlıdır. Örneğin, havuç dokuları azalan etkinlikte olmak üzere şekerleri şu sırayla kullanırlar: Sukroz, glukoz, maltoz, rafinoz, fruktoz, galaktoz, mannoz ve laktoz (KOBLITZ, 1972).

Sukroz içeren besiyerinden elde edilen bu sonuçlar diğer karbon kaynaklarını içeren besiyerlerinden elde edilenlere göre daha yüksek değerlere sahiptir. Sukrozdan sonra en iyi sonuçlar sırasıyla; maltoz, glukoz ve fruktozlu besiyerlerinden elde edilmiştir. Arpa ve mısır embriyolarının in vitro şartlarda gelişmelerine iyi etkide bulunmayan ve belki de olumsuz yönde etki eden şekerler ise laktoz ve galaktozdur. Laktoz, glukoz ve galaktoz birimlerinden oluşan bir disakkarittir. Bitki hücrelerinde bu disakkariti hidrolize edebilecek β -galaktosidaz enzimi bulunmamaktadır. Dolayısıyla bu şekerin kullanılması söz konusu olmamaktadır. Ancak muhtemelen otoklavlanma sırasında laktoz azda olsa hidrolizlenir ve hidroliz ürünlerinden glukoz

bitki embriyolarınca alınabilir. Diğer hidroliz ürünü olan galaktozun hücre içine alınmasında rol oynayan α -galaktozidaz enzimi (bir eksopolisakkaridaz olup mannozun yan zincirlerinde galaktozu hidroliz eder) baklagiller için spesifiktir (BEWLEY ve BLACK, 1983). Gramineae de ise bu enzim muhtemelen çok düşük düzeydedir, böylelikle laktoz ve galaktozun embriyolar tarafından karbon kaynağı olarak yararlanma olasılığı çok zayıflamaktadır.

Mısır ve arpa embriyolarının gelişmelerine iyi etkide bulunan şekerlerin bu etkiyi nasıl gerçekleştirdikleri tam olarak bilinmemektedir. Örneğin, bitki hücre süspanسیون kültürlerinde gelişmeyi en iyi destekleyen karbon kaynakları olarak sukroz ve glukoz bulunmuştur (FOWLER ve STEPAN - SARKISSIAN, 1985). Sukroz; glukoz ve fruktoz birimleri içeren, redüklenmeyen bir disakkarittir. Maltoz ise glukoz birimlerinden oluştuğu için redüklenebilir. Zira bu yapıda serbest aldehit grupları mevcuttur. Gerek sukroz, gerekse maltoz hücre dışında hidrolizlenmekte daha sonra hidroliz ürünleri hücre içine alınmaktadır.

Glukozun hücreler tarafından alınması ise aktif transport (MARETZKI ve THOM, 1972) yada pasif olarak (RARR ve EDELMAN, 1976) gerçekleşmektedir.

Öte yandan sukrozun bir fitohormon rolü oynayabileceği öne sürülmektedir (CARCELLAR et.al. 1971). Bugün için bu varsayım geniş olarak destek görmemekle beraber aksini öne sürecektir bulgular mevcut değildir (FOWLER ve STEPAN-SARKISSIAN, 1985). Sukroz ve yapısında bulunan şekerlerin otoklavlanma sonucu büyümeyi teşvik ettiği bildirilmektedir. KOBLITZ (1972)'e göre önemsiz olan bu durum, PILET ve GOLAZ (1985) tarafından önemli olduğu öne sürülmektedir. Zira mısır kök kültürlerini in vitro koşullarda gerçekleştiren araştırmacılar, en iyi kök gelişmesinin ışıktaki ve otoklavlanmış besiyerinde gerçekleştiğini gözlemişlerdir. Bu durumun otoklavlanma esnasında glukoz ve fruktozun besiyerine salındığı ve bu şekerlerin ışıktaki kök gelişmesini düzenlediği varsayılmıştır (PILET ve GOLAZ, 1985). Ancak tüm bu bulgulara rağmen, eksojen kaynaklı şekerlerin bitki hücre ve doku kültürlerinin gelişmesi üzerine etkileri konusunda yeterli bilgi bulunmamaktadır.

Çalışmada kullanılan tüm şekerler % 4 lük konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Dolayısıyla aralarında konsantrasyon farklılıkları söz konusu değildir. Buna karşılık sukrozun diğer karbon kaynaklarına göre üstünlüğü şu şekilde özetlenebilir;

a) Sukroz, indirgenmeyen bir disakkarit olup, besiyeri sterilizasyonu için otoklavlanma esnasında kısmen hidroliz olabilir. Ancak hidroliz işleminin büyük oranda bitki hücrelerinin hidrolitik enzimlerince sağlandığı bilinmektedir.

b) Hidroliz ürünleri olan glukoz ve fruktoz hücre içine girmekte ve hücrede merkezi metabolik yoldan geçerek, nişasta halinde depolanmaktadır. Dolayısıyla sukrozun hidroliz ürünleri gerektiği zaman kullanılabilecek bir form'a dönüşmektedir (FOWLER ve STEPAN - SERKISSIAN, 1985).

Çalışmada kullanılan ve embriyo gelişmesine iyi etkide bulunan diğer şekerler için yukarıda anılan durumlar geçerli değildir. Örneğin, maltoz indirgenebilen bir disakkarittir. Glukoz ise hücre içine alınır alınmaz çok büyük miktarları reaksiyona girmektedir. Dolayısıyla yıkım hızı daha kısa süreli olmaktadır. Fruktoz için bu durum tam olarak anlaşılmamıştır (POWER ve STEPAN - SARKISSIAN, 1985).

Elde edilen sonuçlar; kök, sürgün ve yaş ağırlıkları yönünden in vitro gelişmeleri incelenen arpa ve mısır embriyolarının, özellikle karbon kaynağı ve bu kaynakça yaratılan osmotik basınçtan büyük ölçüde etkilendiğini göstermektedir. Öte yandan 4.6 - 7.0 arasındaki pH aralığında

embriyolar yeterli düzeyde gelişmekle beraber, en yüksek verimin 5.6 ve 5.8 de elde edildiği gözlenmiştir. Yine arpa ve mısır embriyolarında en iyi gelişme % 4 lük sukroz içeren besiyerlerinden elde edilmiştir.

6. ÖZET

Bu çalışmada; mısır (Zea mays L.) ve arpa (Hordeum vulgare L.) olgunlaşmış embriyolarının in vitro kültürleri üzerine farklı pH değerlerinin, çeşitli şekerlerin ve sukroz konsantrasyonlarının etkileri araştırılmıştır.

Bitki embriyolarının gelişmesi üzerine pH etkisini araştırmak için dokuz farklı pH değeri denenmiştir (4.6, 5.2, 5.4, 5.6, 5.8, 6.0, 6.2, 6.4 ve 7.0). Denen tüm pH değerlerinin embriyoların gelişmesi üzerine olumsuz bir etkide bulunmadığı ve bitki embriyolarının hafif asidik (4.6-7.0) ve nötral (7.6) pH'da yeterli gelişme gösterebileceği sonucuna varılmıştır.

Diğer taraftan, çeşitli şekerler ile sukroz konsantrasyonlarının embriyoların gelişmesi üzerine önemli etkileri olduğu gözlenmiştir. Çeşitli şekerlerin etkilerini araştırmak için; glukoz, fruktoz, galaktoz gibi monosakkaritler ve sukroz, maltoz, laktoz gibi disakkaritler denenmiştir. Tüm şekerler % 4 lük konsantrasyonda hazırlanmıştır. Embriyoların gelişmesi üzerine, denen şekerlerin hiçbirinin sukroz kadar etkin olmadığı bulunmuştur. Embriyoların gelişmesi üzerine en zayıf etkiyi ise laktoz veya galaktoz içeren besiyerleri sağlamıştır. Denenen şeker-

ler azalan etkinlikte olmak üzere sırasıyla; sukroz, maltoz, glukoz, fruktoz, laktoz ve galaktozdur. En etkin şekerin sukroz olduğu bulunduğundan sonra embriyoların gelişmesi üzerine farklı sukroz konsantrasyonlarının etkileri araştırılmıştır. Besiyerindeki sukroz konsantrasyonu arttıkça, embriyolardaki gelişmenin azaldığı gözlenmiştir. Bu duruma muhtemelen kültür ortamındaki yüksek osmotik basıncın neden olabileceği öne sürülmüştür. Diğer taraftan en iyi gelişmenin % 4 lük sukroz konsantrasyonu içeren besiyerlerinde gerçekleştiği gözlenmiştir.

Aynı şartlar altında kültürü yapılan mısır ve arpa embriyolarında benzer gelişme özellikleri gözlenmiştir. Bu durum her iki bitki embriyolarının denenen besiyeri faktörlerinden aynı şekilde etkilendiğini göstermektedir.

SUMMARY

In this study; the effects of different pH values, various sugars and sucrose concentrations on in vitro cultures of mature embryos of maize (Zea mays L.) and barley (Hordeum vulgare L.) were investigated.

In order to investigate the effect of pH on growth of plant embryos, nine different pH values have been tested (4.6, 5.2, 5.4, 5.6, 5.8, 6.0, 6.2, 6.4 and 7.0). It has been concluded that any negative effects of all tested pH values on growth of plant embryos is not found and these plant embryos could show efficient growth at slightly acidic (pH: 4.6 - 7.0) and neutral (7.0) pH.

On the other hand, it has been observed that various sugars and sucrose concentrations had significant effects on the growth of embryos. In order to investigate the effects of various sugars, monosaccharides such as glucose, fructose and galactose and disaccharides such as sucrose, maltose, lactose have been tested. All sugars were prepared at % 4 concentration. It has been found that none of the tested sugars on the growth of embryos was as effective as sucrose. The weakest effect on growth of embryos, however has provided by media containing lactose or galactose.

Tested sugar with decreasing effect are sucrose, maltose, glucose, fructose, lactose and galactose respectively.

The effects of various sucrose concentration upon the growth of embryos have been searched, after it was found that the most effective sugar was sucrose. It has also been observed that the growth in embryos had been decreasing while the sucrose concentration increased in medium. It has been asserted that high osmotic pressure in the culture medium would probably cause this situation. On the other hand, it has been observed that the best growth occurred in medium including % 4 sucrose concentration.

It has been observed that embryos of maize and barley cultured under the same conditions, showed similar growth patterns. This situation indicates that both plant embryos are effected by the tested medium factors in the same way.

7. KAYNAKLAR

- BAJAJ, Y.P.S., (1976) Regeneration of plants from cell suspensions frozen at -20, -70 and -176 °C. *Physiol. Plant.* 37, 263 - 268.
- BAJAJ, Y.P.S., (1979) Test-tube fertilization and development of maize (*Zea mays* L.) plants. *Ind. Jour. Exp. Biol.* 17, 475 - 478.
- BALL, E., (1959) Growth of embryo of Ginkgo biloba under experimental conditions. III. Growth rates of root and shoot upon media absorbed through the cotyledons. *Amer. J. Bot.* 46, 130 - 139.
- BEWLEY, J.D. and BLACK, M., (1983) Physiology and biochemistry of seed (Volume I) Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg-New York. pp. 306.
- BLUM, A. and EBERSON, A., (1976) Genotype responses in sorghum to drought stress III. Free proline accumulation and drought resistance. *Crop. Sci.* 16, 428 - 431.
- BOUHARMONT, J., (1961) Embryo culture of rice on sterile medium. *Euphytica* 10, 283 - 293.

- BRIGHT, S.W.J., WOOD, E.A, MIFLIN, B.J., (1978) The effect of Aspartat derived aminoacids (Lysine, Threonine, Methionine) on growth of excised embryos of wheat and barley. *Planta*, 139, 113 - 117.
- BRIGHT, S.W.J., NORBURY, P.B. and MIFLIN, B.J., (1979) Isolation of a recessive barley mutant resistant to S- (2-Aminoethyl) L-cysteine. *Theor. Appl. Genet.* 55, 1 - 4.
- BRIGHT, S.W.J., JARRETT, V., NELSON, R., CREISSEN, G., KARP, A., FRANKLIN, J., NORBURY, A., KUEH, J., ROGNES, S., MIFLIN, B.J., (1982) Modification of agronomic traits using in vitro technology. In *Plant Biotechnology* (ed. Mantell, S.H. and Smith, H.E.) pp. 258 - 262, Cambridge University Press.
- BRIGHT, S.W.J., KUEH, J.S.H., FRANKLIN, J., ROGNES, S.E. and MIFLIN, B.J., (1982) Two genes for threonin accumulation in barley seeds. *Nature*, 299, 278 - 279.
- BRINK, R.A., COOPER, C.D. and AUSERMANN, L.E., (1944) A hybrid between Hordeum jubatum and Secale cereale, *Jour. Hered.* 35, 67 - 74.
- BUTCHER, D.N. and INGRAM, D.S., (1976) From single cells to plants. Cambridge University Press. 66 pp.

- CARCELLAR, M., DANNEY, M.R., FOWLER, M.W., and STREET, H.E.,
(1971) The influence of sucrose, 2,4-D and kinetin
on the growth, fine structure and lignin content of
cultured sycamore cells. *Protoplasma* 73, 367-374.
- CHOUDHURY, B., (1955) Embryo culture technique III. "Emb-
ryo factors" and immature tomato embryos. *Ind. Jour.*
Hered. 12, 152-154.
- DAVIES, D.R., (1960) The embryo culture of inter-specific
hybrids of Hordeum. *New Phytol.* 59, 9-14.
- DIETERICH, K., (1924) Über die Kultur von Embryonen aus-
serhalb des Samens. *Flora* 117, 379-417.
- DOERPINGHAUS, S.L., (1948) Differences between species of
Datura in utilization of five carbohydrates. *Amer. J.*
Bot. 34, 583 (abstract).
- DUNCAN, D.B., (1955) Multiple range and multiple F-tests.
Biometrics 11, 1-41.
- DÜZGÜNEŞ, O., (1963) İstatistik prensipleri ve metodları.
Ege Üniversitesi Matbaası, İzmir, VIII, 375 s.
- FAHN, A., (1981) Plant anatomy. Pergamon press, pp 464-466.
- FARQUHARSON, L.I., (1957) Hybridization of Tripsacum and
Zea. *Jour. Hered.* 48, 295-299.

- FERGUSON, J.D., STREET, H.E. and DAVID, S.B., (1958) The carbohydrate nutrition of tomato roots. *Ann. Bot.* 22, 513 - 524.
- FOWLER, M.W. and STEPAN - SARKISSIAN, G., (1985) Carbohydrate source, biomass productivity and natural product yield in cell suspension cultures. In *Primary and secondary metabolism of Plant Cell Cultures*, ed. by Neumann, K.H, Barz, W. and Reinhard, E. Springer - Verlag Berlin - Heidelberg New York Tokyo pp. 66 - 73.
- FRANKEL, O.H. and SOULE, M.E., (1981) Conservation and evolution. Cambridge University Press. pp. 238 - 241.
- GREEN, C.E. and PHILLIPS, S., (1975) Plant regeneration from tissue cultures of maize (Zea mays L.) *Crop. Sci.* 15, 417 - 421.
- GROUT, B.W.W., (1979) Low temperature storage of imbibed tomato seeds; a model for recalcitrant seed storage. *Cryo Letters* 1, 71 - 76.
- HABERLANDT, G., (1902) Kulturversuche mit isolierten Pflanzellen. *Sitzungsb. Akd. Wiss. Wien. Math. Nat.* Kl. 3, 69 - 92.
- HANNIG, E., (1904) Zur Physiologie pflanzlicher Embryonen. *Bot. Zeitg.* 62, 45 - 80.

- HIBBERD, K.A., WALTER, T., GREEN, C.E. and GENGEBACH, B.G.,
(1980) Selection and characterization of a Feed-back
Insensitive tissue culture of maize. *Planta* 148,
183 - 187.
- JONES, L.H., (1974) Long term survival embryos of carrot
(Daucus carota L.). *Plant. Sci. Letters*, 2, 221 - 224.
- KARP, A. and MADDOCK, S.E., (1984) Chromosome variation in
wheat plants regenerated from cultured immature embryos.
Theor. Appl. Genet. 67, 249 - 255.
- KESTER, D.E. and HESSE, C.O. (1955) Embryo culture of peach
varieties in relation to season of ripening. *Proc.
Amer. Soc. Hort. Sci.* 65, 265 - 273.
- KLEIN, R.M. and MANOS, G.E., (1960) Use of metal chelats
for plant tissue cultures. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 88,
416 - 425.
- KOBLITZ, H., (1972) *Zell - und Gewebezüchtung bei Pflanzen*,
Gustav Fisher Verlag Stuttgart, 84 pp.
- KONZAK, C.F., RANDOLPH, L.F. and JENSEN, N.F., (1951) Embryo
culture of barley species hybrids. *Jour. Hered.* 42,
125 - 134.
- KNUDSON, L., (1941) Non symbiotic germination of orchid
seeds. *Bot. Gaz.* 73, 1 - 25.

- KROLOW, K.D., (1970) Untersuchungen über die Kreuzbarkeit zwischen Weizen und Roggen. Z. Pflanzenzüchtg, 64, 44 - 72.
- KROLOW, K.D., (1985) Triticale in "Lehrbuch der züchtung landwirtschaftlicher Kulturpflanzen. Ed. Hoffmann, W. et.al. Verlag Paul - Parey Hamburg - Berlin pp.67-77.
- LAIBACH, F., (1925) Das Taubwerden von Bastardsamen und die künstliche Aufzucht früh absterbender Bastard-Embryonen. Zeits Bot. 17, 417 - 459.
- LAIBACH, F., (1929) Ectogenesis in plants. Methods and genetic possibilities of propagating embryos otherwise dying in the seed. Jour. Hered. 20, 201 - 208.
- LAZAR, M.D., COLLINS, G.B., VIAN, W.E., (1983) Genetic and environmental effects on the growth and differentiation of somatic cell cultures. Jour. Hered. 74, 353-357.
- MADDOCK, S.E., LANCASTER, V.A., RISIOTT, R. and FRNAKLIN, J., (1983) Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescens of 25 cultivars of wheat (Triticum aestivum L.). Jour. Exp. Bot. 34, 915 - 926.
- MARETZKI, K. and THOM, A., (1972) The existence of two membrane transport systems for glucose in suspensions

of sugarcane cells. Biochem. biophys. Res. Commun. 47, 44 - 50.

MELCHERS, G., (1977) Kombination somatischer und konventioneller Genetik für die Pflanzenzüchtung. Naturwissenschaften 64, 184 - 194.

MOORE, T.C., (1981) Research experiences in Plant Physiology. Springer - Verlag pp. 175 - 176.

MURASHIGE, T. and SKOOG, F., (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15, 473 - 497.

NAGATO, Y., (1979) Incorporation of H^3 - Uridine and H^3 - leucine during early embryogenesis of rice and barley in caryopsis culture. Plant and Cell Physiol. 20 (4), 765 - 773.

NAKAJIMA, T. and MORISHIMA, H., (1958) Studies on embryo culture in plants. II. Embryo culture of interspecific hybrids of Oryza. Jap. J. Breed. 8, 105 - 110.

NAPIER, K.V. and WALTON, P.D., (1983) Hybrids between Agropyron trachycaulum and A. intermedium. Euphytica 32, 231 - 239.

- NARAYASWAMI, S., (1963) Studies on growth of excised grass embryos in culture. In Plant Tissue and Organ Culture ed. P. Mahesvary and N.S.R. Sweny pp. 302 - 313.
- NICKELL, L.G., (1951) Embryo culture of weeping crabapple. Proc. Amer. Soc. hort. Sci. 57, 401-405.
- NORSTOG, K., (1956) The growth of barley embryos on coconut milk media. Bull. Torrey. Bot. Club. 83, 876-884.
- NORSTOG, K., (1961) The growth and differentiation of cultured barley embryos. Amer. J. Bot. 48, 876-883.
- NOWICK, E.M., (1986) Chromosome pairing in Oryza sativa L. X O. latifolia Desv. Hybrids. Can. J. Genet. Cytol. 28, 278-281.
- OETTLER, G., (1983) Crossability and embryo development in wheat-rye hybrids. Euphytica 32, 593-600.
- OETTLER, G., (1984) Parental effects on crossability. Embryo differentiation and plantlet recovery in wheat X rye hybrids. Euphytica, 33, 233-239.
- OZIAS-AKINS, P. and VASIL, I.K., (1982) Plant regeneration from immature embryos and inflorescences of Triticum aestivum L. (wheat), evidence for somatic embryogenesis. Protoplasma 110, 95-105.

- PARR, D. and EDELMAN, J., (1976) Passage of sugars across the plasmalemma of carrot callus cells. *Phytochemistry* 15, 619 - 630.
- PICKERING, R.A., (1983) The influence of genotype on doubled haploid barley production. *Euphytica* 32, 863 - 876.
- PICKERING, R.A. and MORGAN, P.W., (1983) Plant regeneration from cultured embryos derived from Hordeum vulgare L. pollinated with H. bulbosum. *Euphytica* 32, 585 - 591.
- PILET, P.E. and GOLAZ, F., (1985) Effect of white light on the growth of aseptically cultured maize roots. *Plant Sci.* 38, 115 - 119.
- RAGHAVAN, V. and TORREY, J.G., (1964) Effects of certain growth substances on the growth and morphogenesis of immature embryos of Capsella in culture. *Plant. Physiol.* 39, 691 - 699.
- RAGHAVAN, V., (1966) Nutrition, growth and morphogenesis of plant embryos. *Biol. Rev.* 41, 1 - 58.
- RANDOLPH, L.F. and COX, L.G., (1943) Factors influencing the germination of Iris seed and the relation of inhibiting substances to embryo dormancy. *Proc. Amer. Soc. hort. Sci.* 43, 284 - 300.

RANDOLPH, L.F., (1945) Embryo culture in Iris seed. Bull. Amer. Iris. Soc. 97, 33-45.

RAPPAPORT, J., (1954) In vitro culture of plant embryos and factors controlling their growth. Bot. Rev. 22, 201-225.

REINERT, J. and YEOMAN, M.M., (1982) Plant cell and Tissue culture, a laboratuary manual. Springer-Verlag 82 pp.

RIJVEN, A., (1952) In vitro studies on the embryo of Capsella bursa-pastoris. Acta. Bot. Neerl. 1, 157-200.

SACHET, M.H., (1948) Fertilization in six incompatible species crosses of Datura. Amer. J. Bot. 35, 302-309.

SAPRE, A.B., (1963) Utilization of embryo culture technique in rice breeding. In Plant Tissue and Organ Culture, ed, P. Maheswari. pp, 314-315, Delhi.

SATINA, S., RAPPAPORT, J. and BLAKESLEE, A.F., (1950) Ovarian tumors connected with incompatible crosses in Datura. Amer. J. Bot. 37, 576-586.

SEIBERT, M. and WETHERBEE, J.B., (1977) Increased survival and differentiation of frozen herbaceous plant organ cultures through cold treatment. Plant. Physiol. 59, 1043-1046.

- SPRINGER, W.D., GREEN, C.H.E. and KOHN, K.A., (1979) A histological examination of tissue culture initiation from immature embryos of maize. *Protoplasma* 101, 269 - 281.
- STEWART, G.R. and LEE, J.A., (1974) The role of proline accumulation in halophytes. *Planta* 100, 279 - 289.
- STINGL, G., (1907) Experimentelle Studie Über die Ernährung von pflanzlichen Embryonen. *Flora* 97, 308 - 331.
- STREET, H.E. and MCGREGOR, S.M., (1952) The carbohydrate nutrition of tomato roots. *Ann. Bot.* 16 (62), 185-198.
- STREET, H.E., (1973). Introduction and laboratory organization, in *Plant Tissue and Cell Culture*. Vol II. ed. H.E. Street, Blackwell Scientific Publications pp, 1-30.
- TAYLOR, J.W., (1957) Growth of non-stratified peach embryos. *Proc. Amer. Soc. hort. Sci.* 69, 148 - 151.
- THOMAS, U.M. and PICKERING, R.A., (1983) Chromosome elimination in Hordeum vulgare X H. bulbosum hybrids. II. Chromosome behaviour in secondary hybrids. *Theor. Appl. Genet.* 66, 141 - 166.
- THOMAS, M.R. and SCOTT, K.J., (1985) Plant regeneration by somatic embryo genesis from callus initiated from

- immature embryos and immature inflorescences of H. vulgare. Jour. Plant Physiol. 121, 159 - 169.
- TUKEY, H.B., (1938) Growth patterns of plant developed from immature embryos in artificial culture. Bot. Gazette 99, 630 - 665.
- UTTAMAN, P., (1949) Embryo culture to obtain F_1 plants of incompatible crosses in corn (maize). Curr. Sci. 18, 297 - 299.
- Van OVERBEEK, J., SIU, R. and HAAGEN - SMITH, A.J., (1944) Factors affecting the growth of Datura embryos in vitro. Amer. J. Bot. 31, 219 - 224.
- VASIL, V., CHIN - YU, L., VASIL, I.K., (1983) Proliferation and plant regeneration from nodal region of Zea mays L. (maize, Gramineae) embryos. Amer. J. Bot. 70 (6), 951 - 954.
- WEIER, E.T., STOCKING, C.R., BARBOUR, G.M., (1974) Botany; An introduction to Plant Biology. John Wiley and Sons.
- WENT, F.W., (1952) Physical factors affecting growth in plants. Princeton University Press.
- WITHERS, L.A. and STREET, H.E., (1977) The freeze - preservation of cultured plant cells. Physiol. Plant. 39, 171 - 178.

WITHERS, L.A. and KING, P.J., (1979) Proline; A novel cryo-protectant for the freeze preservation of cultured cells of Zea mays L. Plant Physiol. 64, 675 - 678.

WITHERS, L.A., (1982) Germplasm storage in plant biotechnology. In plant biotechnology, ed.by S.H. Mantell, H, Smith. Cembridge University Press. pp. 209 - 211.

ZENKTELLER, M. and NITZSCHE, W., (1984) Wide hybridization experiments in cereals. Theor. Appl. Genet. 68, 311 - 315.

ZIEBUR, N.K. and BRINK, R.A., (1947) Growth in vitro of immature Hordeum embryos. Science, 106, 547 - 548.

ZIEBUR, N.K. and BRINK, R.A., (1950) The effect of casein hydrolysate on the growth in vitro of immature embryos. Amer. J. Bot. 37, 144 - 148.

ZIEBUR, N.K. and BRINK, R.A., (1951) Immature plant embryos in vitro. Amer. J. Bot. 38, 253 - 256.

