

28916

T.C.
YUZUNCU YIL UNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTUSU
TARLA BİTKİLERİ ANA BİLİM DALI

BUĞDAYDA IN VITRO KOŞULLARDA KALLUS
ELDE EDİLMESİ ÜZERİNE BİR ARASTIRMA

ÖZNUR KARACA
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yönetici: Yrd.Doç.Dr. Betül BURUN

VAN - 1993


T.C.
YUZUNCU YIL UNIVERSITESI
FEN BİLİMLERİ ENSTİTUSU
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI


BUGDAYDA IN VITRO KOŞULLARDA KALLUS
ELDE EDİLMESİ ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA


ÖZNER KARACA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yönetici: Yrd. Doç. Dr. Betül Bürün


Prof. Dr. Cengiz Andic
ÜYE


Prof. Dr. Erol Günel
BAŞKAN


Yrd. Doç. Dr. Betül Bürün
ÜYE

TEZ KABUL TARİHİ

T.C. YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
DOKÜMAN YAKLAŞIM MERKEZİ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No.

ÇİZELGE ve ŞEKİL LİSTESİ

ÖNSÖZ

ABSTRAKT

1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	6
2.1. Yaprak Parçası ile Yapılan Kùltürler	7
2.2. Anter Kùltürü Çalışmaları	9
2.3. Olgunlaşmamış ve Olgunlaşmış Embriyo Kùltürü Çalışmaları	14
3. MATERYAL ve METOT	17
3.1. Materyal	17
3.1.1. Bitkisel Materyaller	17
3.1.1.1. Yaprak Materyali	17
3.1.1.2. Anter	19
3.1.1.3. Olgunlaşmamış Embriyo	20
3.1.1.4. Olgunlaşmış Embriyo	20
3.1.2. Kimyasal Materyal	20
3.2. Metod	22
3.2.1. Bitkisel Materyallerin Kùltüre Alınma Dönemleri	
3.2.1.1. Yaprak Parçalarının Kùltüre Alındığı Dönem	22
3.2.1.2. Anterlerin Kùltüre A- lındığı Dönem	22

3.2.1.3. Olgunlaşmamış Embriyoların Kültüre Alındığı Dönem	23
3.2.2. Bitkisel Materyallerin Sterilizasyonu	23
3.2.3. Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu	24
3.2.4. Besin Ortamının Hazırlanması ve Sterilizasyonu	24
3.2.5. Bitkisel Materyalin Tüplere Aktarılması	25
3.2.6. Kültür Odası Şartları	26
3.2.7. Denemenin Düzenlenmesi ve Değerlendirilmesi	26
4. BULGULAR	28
4.1. Yaprak Parçalarının Kültüründen Elde Edilen, Kallus, Sürgün ve Kök oluşumları	28
4.2. Materyal Olarak Anterlerin Kullanıldığı Deneme Sonuçları	38
4.3. Olgunlaşmamış Embriyoların Kültüre Alındığı Denemelerde Elde Edilen Kallus, Sürgün ve Kök Oluşumları	38
4.4. Olgunlaşmış Embriyoların Kültüründen Elde Edilen Kallus, Sürgün ve Kök Oluşumları	49

4.5. % Kallus Oluşum Oranlarına Göre Ortamların Değerlendirilmesi	59
4.6. Kallus Ağırlıklarına Göre Ortamların Değerlendirilmesi	59
5. TARTIŞMA	64
5.1. Yaprak Parçası Kültürü	64
5.2. Anter Kültürü	66
5.3. Olgunlaşmamış Embriyo Kültürü	67
5.4. Olgunlaşmış Embriyo Kültürü	69
6. SONUÇ	70
ÖZET	73
SUMMARY	75
LİTERATUR	77

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa No.

Çizelge 1- Temel MS (1962) ortamı	21
Çizelge 2- Temel MS (1962) ortamına ilava edilen maddeler ve miktarları	22
Çizelge 3- Temel MS (1962) ortamına ilave edilen maddeler ile ortam adları	24
Çizelge 4- Mayıs 1992 ile aralık 1992 ayları arasında kültür odasına ait ortalama, maksimum ve minimum sıcaklıklar (°C)	26
Çizelge 5- 3 no'lu yaprak materyali ile yapılan kültür sonunda belirlenen ortalama eksplant uzunlukları (cm)	30
Çizelge 6- Hormonsuz MS ortamında çimlendirilmiş fidelerden alınan 1,2,3,4 no'lu parçaların kültüründen elde edilen kallus ve sürgün gözlenen tüp sayıları ile kallus oluşum oranları	31
Çizelge 7- Hormonsuz MS ortamında çimlendirilmiş fidelerin 1 no'lu parçalarının kültüre alınmasından elde edilen kallus, sürgün ve kök sayıları ile kallus oluşum oranları	34
Çizelge 8- 5 no'lu yaprak materyallerinden oluşan kallusların ağırlıklarının en küçük kareler ortalamalarına göre çoklu karşılaştırma testi	35

- Çizelge 9- 5 no'lu yaprak materyalinin kültürü ile elde edilen kallusların ağırlıkları ile sürgün uzunlukları 36
- Çizelge 10- Yaprak materyali-5'deki 1 no'lu eksplanttan oluşan kallusların ağırlıklarına göre, ortamların en küçük kareler ortalamaları ve standart hataları 37
- Çizelge 11- 9-10 günlük embriyoların kültüründen elde edilen kallus, sürgün ve kök oluşumu gözlenen tüp sayıları ile kallus oluşum oranları 40
- Çizelge 12- 15-16 günlük embriyoların, kültüründen elde edilen kallus, sürgün ve kök oluşumu gözlenen tüp sayıları ile kallus oluşum oranları 41
- Çizelge 13- 15-16 günlük embriyolardan elde edilen kallus oluşum oranlarının en küçük kareler ortalamalarına ilişkin çoklu karşılaştırma testi 42
- Çizelge 14- 15-16 günlük embriyolardan oluşan kallusların, ağırlıkları ile sürgün uzunlukları 43
- Çizelge 15- Olgunlaşmamış embriyolardan (15-16 lük) oluşan kallus ağırlıklarının, en küçük kareler ortalamaları ve stan-

dart hataları	44
Çizelge 16- Ön denemede, olgunlaşmış embriyolardan elde edilen kallus, sürgün ve kök oluşumu gözlenen tüp sayıları ile kallus oluşum oranları	50
Çizelge 17- İkinci yıl olgunlaşmış embriyoların kültüründen elde edilen, kallus sürgün ve kök oluşumu gözlenen tüp sayıları ile kallus oluşum oranları	51
Çizelge 18- Olgunlaşmış embriyolardan elde edilen kallus oluşum oranlarının en küçük kareler ortalamalarına ilişkin çoklu karşılaştırma testi	53
Çizelge 19- Olgunlaşmış embriyolardan oluşan kallusların, max., min. ve ort. ağırlıkları ile sürgünlerin max., min. ve ort. uzunlukları	54
Çizelge 20- Olgunlaşmış embriyolardan oluşan kallusların ağırlıklarının , ortam ve yıllara göre, en küçük kareler ortalamaları ve standart hataları (çoklu karşılaştırma yöntemine göre)	55
Çizelge 21- Kallus oluşum oranlarına göre, ortamların varyans analiz tablosu	60

- Çizelge 22- Kallus oluşum oranlarının en küçük kareler ortalamaları içinde, ortamlara göre çoklu karşılaştırma testi 60
- Çizelge 23- Üç bitkisel materyalden elde edilen kallus ağırlıklarının, ortam, eksplant, ortamxeksplant ve yıl kaynaklarına göre varyans analiz tablosu 62
- Çizelge 24- Kallus ağırlıklarının en küçük kareler ortalamalarına göre, ortamların çoklu karşılaştırma testi 63

SEKİL LİSTESİ

	Sayfa No.
Şekil 1- Kültüre alınan 2 no'lu yaprak materyalinin sematik görünümü	18
Şekil 2- Kültüre alınan 3 no'lu yaprak materyalinin sematik görünümü	18
Şekil 3- Hormonsuz MS (1962) ortamında yetiştirilmiş bir haftalık fidenin, kültüre alınan bölümleri	19
Şekil 4- Hormonsuz MS ortamında yetiştirilen bir haftalık fidelerin, kökün üst kısmındaki 0.5 cm'lik parçalarından oluşan kallus ve sürgün	32
Şekil 5- 5 no'lu yaprak materyalinden oluşan kallus ve sürgün görünümü	33
Şekil 6- Şekil 5'deki kallusların, tüpten çıkarıldıktan sonraki görünümleri	33
Şekil 7- Dört ortamda 15-16 günlük olgunlaşmamış embriyodan oluşan kallusların tüpteki görünümleri	44
Şekil 8- Ortam-1'de 9-10 günlük embriyolardan oluşan kalluslar	45
Şekil 9- Ortam-2'de 9-10 günlük embriyolardan oluşan kalluslar	45
Şekil 10- Ortam-3'de 9-10 günlük embriyolardan oluşan kalluslar	45
Şekil 11- Ortam-4'de 9-10 günlük embriyolardan	

	Sayfa No.
oluşan kalluslar	46
Sekil 12- Ortam-1'de 15-16 günlük olgunlaşmamış embriyodan gelişen kallus ve sürgünlerin görünümü	46
Sekil 13- Ortam-2'de 15-16 günlük olgunlaşmamış embriyodan gelişen kallus ve sürgünlerin görünümü	47
Sekil 14- Ortam-2'de 15-16 günlük olgunlaşmamış embriyodan gelişen kalluslar	47
Sekil 15- Ortam-3'de 15-16 günlük olgunlaşmamış embriyodan gelişen kallus ve sürgünlerin görünümü	48
Sekil 16- Ortam-4'de 15-16 günlük olgunlaşmamış embriyodan gelişen kallus ve sürgünlerin görünümü	48
Sekil 17- Ortam-1'de olgunlaşmış embriyo kültüründen oluşan kallus, sürgün ve köklerin görünümleri	56
Sekil 18- Ortam-2'de olgunlaşmış embriyo kültüründen oluşan kallus, sürgün ve köklerin görünümleri	57
Sekil 19- Ortam-3'de olgunlaşmış embriyo kültüründen oluşan kallus, sürgün ve köklerin görünümleri	57
Sekil 20- Ortam-4'de olgunlaşmış embriyo kültüründen oluşan kallus, sürgün ve köklerin	

	Sayfa No.
görünümleri	58
Sekil 21- Olgunlaşmış embriyolardan oluşan kal- lusların, enfeksiyonlu tüplerdeki görünümleri	58
Sekil 22- Ortamlara ve eksplantlara göre kallus oluşum oranları	61
Sekil 23- Ortamlara ve eksplantlara göre ortalama kallus ağırlıkları	63



I

ÖNSÖZ

Tarımsal üretimde verim ve kaliteyi arttırmak için yetiştirme tekniklerinin geliştirilmesi yanında, ıslah çalışmaları da önemli bir yer tutmaktadır. Islah çalışmalarında kullanılan klasik ıslah metotlarının yanısıra Doku Kültürü tekniklerinden de yararlanılmaktadır. Özellikle son yıllarda, temel çalışmalarla birlikte pratik amaçlar için bu teknikle yapılan uygulamalarda da büyük ilerlemeler kaydedilmiştir.

Bu konudaki çalışmalar, ülkemizde son 10 yıl içinde hız kazanmıştır. Söz konusu yöntem; vegetatif üretim, somatik embriyogenesis ile bitkicik elde edilmesi, haploidlerin elde edilmesi, protoplastlara DNA transferi gibi genetik tekniklerde kullanılması, somatik melezlerin elde edilmesi, hastalık ve zararlılarla mücadele, virüssüz bitki elde edilmesi, genetik stokların muhafazası ve materyal değiş tokuşu, metabolit üretimi ile fizyolojik ve biyolojik çalışmalarda yararlanma amaçları bakımından önem kazanmıştır. Değişik doku kültürü tiplerinden bir tanesi de kallus kültürüdür. Farklılaşmamış hücre yığını olan kallus dokusu, uygun gıda ortamında elde edildikten sonra değişik amaçlar için kullanılmaktadır. Örneğin bitkinin değişik kısımlarından alınan parçalardan elde edilen kalluslarla somatik embriyolar ve bitkiler, anterlerden direkt veya kallustan farklılaşma ile bitki ıslahı açısından önem taşıyan haploid bitkiler, embriyolardan oluşan kalluslarla da birden fazla bitkicik elde etme olanağı sağlanmaktadır. Ayrıca, kallus dokusunun sıvı

II

~~gıda~~ ortamına aktarılması ile çeşitli amaçlar için hücre veya hücre süspansiyon kültürleri yapılmaktadır.

Bu araştırmada , buğdayın değişik kısımlarından alınan bitkisel materyallerden kallus elde etmek için, en uygun gıda ortamının saptanmasına çalışılmıştır.

Bu konuda, bana çalışma olanağı veren ve yardımlarını esirgemeyen hocam sayın Yrd.Doc.Dr. Betül Bürün'e. ayrıca elde ettiğim deneme verilerinin değerlendirilmesinde yardımcı olan Sayın Yrd.Doc.Dr. Hayrettin Okut'a teşekkür ederim.



ABSTRAKT

Kallus kültürü için: Doğu-68 buğday çeşidinin, yaprak parçaları, anterleri, olgunlaşmamış ve olgunlaşmış embriyoları, 4 farklı madde ilavesi yapılan MS ortamında kültüre alınmıştır. Anterler dışında, diğer bitkisel materyallerden kallus oluşumu gözlemlenmiştir. En yüksek kallus oluşum oranı embriyolar ile ortam-1 (MS+2mg/l 2,4-D) (ort.%95) ve ortam-2'de (MS+2mg/l 2,4-D+1mg/l Kinetin) (ort.%92) meydana gelmiştir. Kallus ağırlıkları bakımından da olgunlaşmış embriyolar en iyi sonucu vermiştir. Kallus oluşum oranları bakımından en iyi sonuç, yaprak parçalarının kültüründe, ortam-1'de, olgunlaşmamış embriyoların kültüründe ise ortam-2'de elde edilmiştir.

ABSTRACT

Leaf segments, anthers, immature and mature embryos of Doğu-68 wheat varieties was cultured for callus culture in MS medium with adding 4 different substances. The callus formation has been observed in all plants material except anthers. The highest callus formation occurred from mature embryos in medium-1 and medium-2. Also mature embryos had given the best result with respect to callus weights. The best result was obtained from leaf segments in medium-1 and from immature embryos in medium-2 with respect to callus formation rates.

1. GİRİŞ

Steril ve kontrollü şartlar altında yapılan *in vitro* kültürler, "Doku Kültürü" olarak tanımlanmaktadır. "Mikro üretim" veya "Aseptik Kültür" olarak da adlandırılmaktadır.(1). *In vitro* bitki ıslahı, eşeyli (seksüel) safhayı kullanmadan bitkiyi, aynı genetik yapısıyla çoğaltmaya ve sitolojik araştırmalar yapmaya yardımcı olan, tüm hücre ve doku kültürü tekniklerini içine almaktadır.(2).

İlk olarak, Haberlandt (1902) tarafından bitki hücrelerinin totipotent özelliğinin bulunması fikri ile, bu hücrelerin, bitkiden izole edildikten sonra, uygun besin ortamı ve çevre şartlarında, alındığı bitkiye benzer bitki oluşturabileceği tespit edilmiştir. 1934'lere gelindiğinde White, doku kültürü için, besin ortamına, seker, inorganik maddeler ve vitaminlerin konulmasının, Gautheret ise, aseptik şartlar altında çalışılmasının gerekliliğini ortaya koymuşlardır. Skoog ve Miller (1957), oksin ve sitokinlerin değişik kombinasyonlarının, tütün kallusundan, kök ve sürgün oluşumunu teşvik ettiğini tespit etmişlerdir(1).

Doku kültürü çalışmaları, gerek pratiğe dönük uygulamalarda gerekse bitkilerin fizyolojik ve biyokimyasal olaylarının ortaya çıkarılmasını amaçlayan temel araştırmalarda kullanılmaktadır(3). Çok sayıda bitkide doku kültürü uygulanmış, ancak az sayıda ekonomik öneme sahip türde bitki devamlılığı sağlanabilmiştir. Birçok bitki türü için *in vitro* araştırmalar henüz başlangıç düzeyindedir.Çok değişik

amaçlar için uygulanan doku kültürlerinin alacağı isimler, başlangıç materyaline göre değişebilmektedir. Örneğin, embriyo, anter, protoplast ve meristem kültürleri gibi(1,2).

Embriyo kültürü, cinsler arası ve türler arası melezlerin elde edilmesine yönelik çalışmalarda, döllenmeden belli bir süre sonra gelişmesini devam ettiremeyen embriyoların yapay besin ortamına alınarak yaşatılmasında, normal dölleme veya başka yollarla elde edilmesi mümkün olmayan melezlerin elde edilmesinde ve dormansinin kırılması olanakını sağlaması açısından önem taşımaktadır. Embriyolar, zedelenmeden çıkarılıp optimum bir kültür ortamına yerleştirilirse, gelişmelerine devam edebilmektedirler. Genç embriyoların, besin ortamından istekleri yaşlı olanlara göre daha fazla ve komplekstir. Embriyo kültürü; üçgülde, pamukta ve fasulyede türler arası, *Triticum x Hordeum*' la cinsler arası melezlerin elde edilmesinde, şeftali, kayısı ve erik gibi meyvelerin geliştirilmesinde başarı ile kullanılmıştır(2).

Normal döllenmeden sapmalar sonucu haploid embriyolar oluşmaktadır. Ancak, doğal olarak ortaya çıkan bu haploidlerin oranı çok düşüktür. Haploidlerin bitki ıslahı ve genetik çalışmalardaki önemi nedeni ile çok sayıda haploid bitki elde edilmesi üzerinde durulmuştur. İlk olarak Guha ve Maheshwari (1964) tarafından, deneysel androgenesis ile, *Datura innoxia* anterlerinden , haploid bitkilerin elde edilmesinden sonra, 1967'de Bourgin ve Nitsch tarafından da, tütünde haploid bitkiler elde edilmiştir. Bugün, anter

kültürü ile birçok türden, haploid bitkiler elde edilmiştir. Anter kültüründe başarıyı etkileyen birçok faktör vardır. Bunlardan bir tanesi kültür ortamının uygunluğudur. Kültürde farklı ortam şartları ve besin ortamının bileşimi, haploid bitki elde edilmesinde önemli olmaktadır(1,2,4,5,6).

Haploid bitkiler bitki ıslahı açısından önem taşımaktadır. Çeşitli yöntemlerle (ısıık şoku, asenaften veya kolhisin uygulamaları ile) haploidlerin kromozom sayılarını ikiye çıkartmakla, tam homozigot dihaploidler elde edilmektedir. Haploidler kendine döllenene bitkilerde saf hatlar, yabancı döllenene bitkilerde ise inbred hatların yerine kullanılabilir. Haploidlerin kombinasyon ıslahında kullanılması ile daha az sayıda bitki ile çalışılmakta ve daha kısa sürede sonuca varılmaktadır. Gen çifti sayısı arttıkça bu yöntemin avantajı artmaktadır(4). Sitogenetik çalışmalar açısından, haploid bitkilerin, mayoz bölünme devresindeki univalentleri daha iyi izlenebilmektedir. Arpa, çavdar, buğday, domates ve celtik bitkilerinde bu yöntem uygulanarak, genetik çalışmaları yapılmıştır(7).

Bir diğer doku kültürü tipi, kallus kültürüdür. Kallus, farklılaşmamış hücre yığıdır. Kallus kültürü ise, izole edilmiş hücre yığınlarının steril kültürüdür. Bitkiden alınan parçaların, uygun gıda ortamında ve çevre şartlarında kültüre alınması ile kallus dokusu oluşmaktadır. Kallus dokusu üzerinde, gıda ortamı ile ışık ve çevre faktörleri, renk, dış görünüş, tekstür ve kompozisyon bakımından farklılıklar meydana getirir. Bazı kallus dokuları daha sıkı bir

yapıya sahipken, bazıları birbirine çok az temas eden hücrelerden oluşması nedeniyle gevşek bir yapı göstermektedir. Ayrıca, renk açısından, bir çok kallus dokusu, pigment içermezken, bazıları soluk yeşil, sarı veya mor renkli olabilmektedir. Kallus kültürü ile elde edilen bitkilerde, poliploidi ve kromozomal kırılmalar gibi bazı sitolojik değişimler görülmektedir. Bu genetik varyasyondan, bitki ıslah programlarında yararlanılmaktadır. Kallus kültüründe, bitkiden alınan parçalar başarıyı etkileyen faktörlerden biridir. Örneğin gövde ve köklerin iletim dokularının yakınındaki kısımlar daha iyi sonuç vermektedir. Bunun yanında meyve, endosperm, polen ve embriyolar da materyal olarak kullanılabilir. Kallus kültüründe başarıyı etkileyen en önemli faktör ise besin ortamıdır. Yapılan çalışmalar, bir bitkinin farklı kısımlarından veya farklı türlerden alınan eksplantlarla yapılan kültürlerde, değişik gıda isteklerinin karşılanması gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Farklı araştırmacılar tarafından oluşturulan ortamlar bu amaçla kullanılmaktadır. Bunun yanında, kallus oluşumunda başarı için, makro ve mikro elementler, vitaminler, karbonhidratlar, organik büyüme faktörleri ve bitki hormonlarının, ortama mutlak konulmasının gerekliliği tespit edilmiştir(1).

Yukarıda belirtilen ve daha bir çok avantajları bakımından dikkate alındığında, kallus elde edilmesi diğer bazı çalışmaların yapılabilmesi ve *in vitro* teknikler ile ıslah çalışmalarına geçebilmek için gereklilik arz etmektedir.

Bu çalışma, kullanılan eksplant türüne göre en uygun

besin ortamının belirlenmesi ve çalışmalarda kullanılacak kallus dokusunun oluşumu için uygun şartların belirlenmesi açısından önem taşımaktadır.



2- LİTERATUR ÖZETİ

Doku kültürlerinde, olgunlaşmamış embriyo, olgunlaşmış embriyo ve anterlerin dışında bitkinin değişik kısımlarından alınan parçalar ile de kallus kültürü yapılabilmektedir. Örneğin yaprak ayasından, yaprak orta damarından, çiçekten alınan parçalar, bu çalışmalarda başarılı bir şekilde kullanılmaktadır(8). Yaprak parçaları ile yapılan doku kültürlerine en uygun bitkilerden birisi *Nicotiana tabaccum*'dur. Kallus oluşumu için gereken maddelerin ortama katılması ile, bu bitkinin gövdesinden kesilen parçalar iyi bir kallus dokusu oluşturmaktadır(1).

Buğdayda doku kültürü çalışmalarının başlangıcı çok yenidir. Son 20 yıl içinde bu yöndeki araştırmaların hız kazandığı görülmektedir(9). Doku kültürünün, tahıllar grubunda uygulanmasının amacı ıslahıdır. Ahloowalia (1982) yaptığı bir çalışmada, buğday kalluslarından elde ettiği bitkilerin, bitki yüksekliği, gövde kalınlığı, yaprak büyüklüğü, başak şekli, pollen fertilitesi ve tohum tutma yönünden farklılıklar gösterdiğini gözlemlemiştir(10). Tahıllarda kallus kültürü çalışmalarında, farklı çeşitlerde, farklı ortamların kullanıldığı dikkati çekmektedir. Bunlardan: Nonstog (N, 1956) (11), Murashige-Skoog (MS, 1962) (1), Bloydes (1966) (12), Gamborg's B5 (1968) (13), Nitsch and Nitsch (1969) (14), Shenk and Hilderbrandt (SH, 1972) (11), Foroughi-Wehr (FW, 1976) (15), Potato-4 (P₄, 1986) (16) ve Potato-2 (P₂, 1989) (17) ortamları belirtilebilir. Buğdayda kallus kültüründe bu ortamlardan en başarılı olarak MS (1962) ortamı ve bunun

modifikasyonlarının kullanıldığı saptanmıştır.

Kallus kültürü çalışmaları, araştırmada kullanılan başlangıç bitki materyaline göre gruplandırılarak 3 başlık altında ele alınmıştır.

2.1. Yaprak Parçası ile Yapılan Kültürler

Greco ve ark. (1984); Durum buğdayının, üç italyan cesidinin (Cappelli, Appulo, Trinakria) tohumlarını, steril şartlarda, hormonsuz MS ortamında çimlendirmişler ve bir haftalık fideilerin köklerinin hemen üst kısmından başlayarak yukarıya doğru 0.5 cm'lik parçalar halinde, dört yaprak parçasını ve mezokotili, 2 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında kültüre almışlardır. Tüm cesitlerde mezokotilin ve en üst yaprak parçasının, yüksek oranda kallus oluşturduğunu saptamışlardır (18)

Prilyuk (1988), *Triticum persicum*, *Triticum timopheevi*, *Triticum militinae* ve *Triticum aestivum* türlerinin, sürgünlerinden aldığı yaprak parçalarının, dip kısımlarını, 20 g/l sükroz, 0.5 mg/l thiamin, 100 mg/l myo-inositol ve 2 mg/l 2,4-D ilavesi yapılmış MS ortamında kültüre almış ve türlerin hepsinde iyi bir kallus oluşumu gözlemmiştir. Kallustan bitki oluşturabilme kapasitesi açısından, *T. persicum*'un en uygun olduğunu belirtmiştir (19).

Aynı araştırmacı (1988) başka bir çalışmada; yine aynı türlerin kallus kültüründe, hangisinin alt kültüre daha uygun olduğunu saptamaya çalışmıştır. Bu amaçla, bitkilerin

Üç yapraklı fide dönemlerinde, yaprakların dip kısımlarından aldığı parçaları 2 mg/l 2.4-D ilavesi yapılmış MS ortamında kültüre almıştır. Dört türde de iyi bir kallus oluşum yeteneği olduğunu tespit etmiştir. Araştırmacı kullandığı eksplantları, serada ve yapay besin ortamında olmak üzere iki farklı ortamda yetistirilen fidelerden almış ve serada yetisen bitkilerin yaprak parçalarından elde edilen kallusların daha fazla bitki oluşturma kapasitesinde olduğunu kaydetmiştir (20).

Grossman ve ark. (1989); buğdayda başlangıç materyali olarak kullanılan fidelere, LAB 150978, tetcyclacis ve CCC gibi engelleyici özelliğe sahip maddelerin, *in vivo* uygulamasından sonra, % 0.6'lık agarlı ortamda, kallus oluşumuna olan etkilerini saptamaya çalışmışlardır. LAB 150978 ve tetcyclacis'in engelleyici özelliklerine karşın, ethylenformingle karışık etephon ilavesi yapılmış MS ortamında, *in vitro*'da kültüre alınan yaprak parçalarının kallus oluşumunda düzenli bir şekilde artış gösterdiğini belirtmişlerdir. Buğday ve buna benzer bitkilerin *in vitro*'daki uygulamalarında, kallus ve sürgün gelişimlerinin, ethylen'e bağlı olarak artış gösterdiğini, bunun yanında, genetiksel özelliklerinin de gelişmede önemli etki yaptığını belirtmişlerdir (21).

Tabaeizade ve ark. (1990): *T. aestivum* x *L. angustus* F₁ hibritlerinin ve ebeveyn hatlarının çiçek ve yaprak parçalarını kültüre alarak, somatik embriyoları üretmişlerdir. Çiçekten alınan parçalardan oluşan bitkilerin farklılaşma

yeteneklerinin, yapraktan alınan parçalara oranla daha iyi olduğunu görmüşlerdir. F₁ hibritleri ile *T. aestivum*'un. *L. angustus*'a göre daha düşük oranda embriyogenik kallus ürettiğini saptamışlardır. Somatik embriyo oluşumu ve gelişimi için, 2,4-D'nin varlığını temel olarak göstermişlerdir. Kallus oluşumunda beş amino asidin (glutamin, prolin, asparajin, aspartik asit ve glutamik asit). ortama konmasının etkisini belirleyememişlerdir.

Sonuçta, elde ettikleri somatik bitkilerin, morfolojik olarak başlangıç materyalinin (orjinal bitkinin) aynısı olduğunu ve bu bitkilerin sitolojik incelemelerinde, hücresel farklılıkların gözlenilmediğini belirtmişlerdir (22).

2.2. Anter Kültürü Çalışmaları

Schaffer ve ark. (1979); Kuzey Amerika buğdaylarının ticari çeşitlerini kullanarak, buğday ıslahında, *in vitro*'da haploidlerin elde edilmesinde en etkin anter kültürü ortamını ve uygun metotları saptamaya çalışmışlardır.

Anter kültürü için, tek çekirdekli devredeki mikrosporları içeren, olgun olmayan anterleri kullanmışlardır. Bu devredeki anterleri, Çin araştırmacı grubu tarafından tarif edilen (Anonymous, 1976). patates ekstraktı içeren % 0.8'lik agarlı ortama yerleştirmişlerdir. 2.5 x 15 cm boyutlarında her deney tüpüne, 5 ile 10 anter bırakmışlardır. Büyüyen haploid dokunun merkezi anterlerden ayrıldıktan sonra, kallus üretimi için, 1 mg/l NAA, 1 mg/l 2,4-D ve 0.1 mg/l 2-IP ilave edilmiş temel MS ortamına aktarmışlardır. Farklı

laştırma ortamı olarak, 0.1 mg/l kinetin ve 5 mg/l IAA ilaveli sıvı MS ortamını veya 1mg/l IAA ilavesi yapılmış yarı katı MS ortamını kullanmışlardır. Tüm MS ortamlarına 146 mg/l oranında glutamin eklemişlerdir.

Sonuçta, tarla ve serada yetiştirilen buğday hatlarından alınan 1411 anterden, 60 anterin kallus oluşturduğunu. 60 kallustan da 21'inin yeşil bitki, 15'inin albino bitki ürettiğini gözlemişlerdir. Histolojik ve sitolojik incelemeler sonunda, embriyoid oluşumunun doğrudan anterden meydana gelebileceği gibi, dolaylı olarak, kallus oluşum yoluyla da meydana gelebileceğini görmüşler ve anterden oluşan bitkilerin çoğunluğunu haploid bularak istedikleri sonuca varmışlardır (23).

De Buyser ve ark. (1981), buğday anterlerini basit patates ortamı ve 1 mg/l IAA, 1 mg/l kinetin ve 10^{-6} M glutamin ilavesi yapılmış N_6 ortamında kültüre almışlardır. Elde ettikleri bitkilerin hepsinin haploid olmadığını belirtmişler ve euploid ve aneuploid olmak üzere iki tür sitolojik varyasyon kaydetmişlerdir. Oluşan bitkilerin % 35' inin diploid ($2n=2x=42$ kromozom) olduğunu tespit etmişlerdir (12).

Gideon ve ark. (1982): pollenleri tetraat safhasında olan buğday anterlerini, 2,4-D'li N_6 ortamında ve basit patates ortamında kültüre almışlardır. Kallus oluşumunda, anterlerin alındığı dönemin, bitki koşullarının, genotipin, anterlerin yüksek ve düşük sıcaklık sokuna tabi tutulmasının ve ortam farklılıklarının etkisi üzerinde durmuşlardır.

Anterlere, çiçekten çıkarılmadan önce soğuk uygulaması yapılmasının yararlı olduğunu ve bayrak yaprağında iken yapılan soğuk uygulamasının tahıllarda androgenesisini teşvik edici etki yaptığını kanıtlamışlardır.

Araştırmacılar bu çalışmalarını sonunda; normal boylu bir çeşitten, geç olgunlaşan fakat canlı ve uzun boylu bir çeşidi, kılçiksiz bir ebeveyninden, kılçıklı bir varyantı elde edebilmişlerdir. Ancak bu bitkilerden bazılarının tip dışı olduğunu ve sitolojik sapmalar gösterdiklerini de belirtmişlerdir (24).

Lazar ve ark. (1983): bes inbred yazlık buğday çeşidinden üretilen diallel populasyonların anterlerini, kallus oluşumu için in vitro'da kültüre alarak kallus oluşum oranı ve kallustan farklılaşma ile oluşan bitkilerin frekansını saptamaya çalışmışlardır. Genel ve özel kombinasyon yeteneklerini tahmin etmişler ve her karakteristik özellik için önemli bulmuşlar, ayrıca resiprokal etkinin de her karakteristik özellik için önemli olduğu sonucuna varmışlardır (25).

Lazar ve ark. (1985), başka bir araştırmalarında, Kriss buğday çeşidinde, yüksek oranda kallus elde edilmesi ve bitki üretimini arttırmak amacıyla, anterlere uygulanan değişik fiziksel muamelelerin etkisini belirlemeye çalışmışlardır. Bu çeşitten aldıkları anterlere, kallus oluşumu ve farklılaşma için; farklı yoğunlukta ve sürede düşük sıcaklık uygulamışlardır. Bunun için; anterleri, petri kaplarında, iki hafta süre ile 4°C'de ve karanlık ortamda bekletmişler,

daha sonra in vitro'da kültüre almışlardır. Sonuçta, % 14 oranında kallus oluşumu ve kalluslardan da % 40 oranında farklılaşma tespit etmişler ve yapılan bu uygulamaların, kallus oluşumunda önemli farklar meydana getirdiğini belirtmişlerdir (26).

Zhag ve ark. (1988), kısıklık buğday populasyonlarının ıslahında, anter kültürü uygulamaları üzerinde durmuşlar ve bir çok akraba ebeveyn arasında dominant Taigu erkek kısırlık genini içeren bir köprü ebeveyn kullanarak melezlemeler yapmışlardır. Bu gruplardan 150 bitkinin anterlerini kültüre aldıklarında, kallus oluşum oranını % 22.1, farklılaşma oranını ise % 9.2 olarak bulmuşlardır. Elde ettikleri sonucun, bir önceki yıl kullanılan intervaryatel melezlerin anterlerinden, elde ettikleri sonuca göre daha yüksek olduğunu saptamışlardır. Farklılaşan bitkilerden, albino olanların oranının ise benzerlik gösterdiğini gözlemişlerdir.

Sonuç olarak, Taigu erkek kısırlık geninin, anter kültürüne olumsuz yönde etki yapmadığını ve elde ettikleri bitkilerin haploid olduğunu tespit etmişler, haploid bitkilerin kromozom sayılarının katlanması ile tarlada normal olarak yetiştirilebilmelerinin mümkün olduğunu da belirtmişlerdir (27).

Hu ve ark.(1988);ekmeklik buğdayla melezlenmiş hexaploid triticales,Taigu erkek kısırlık genini taşıyan melezler ve *Aegilops* melezlerinin anterlerini kültüre almışlardır.Elde ettikleri bitkilerin, sabit kromozom yapısında ve *Erysiphe graminis*'e dayanıklı olduklarını görmüşler,ayrıca bu bitki-

lêrin, kısa sap, erken olgunlaşma ve pas hastalığına dayanıklı maddeler içermeye gibi yararlı karakterlere de sahip olduklarını ortaya çıkarmışlardır (28).

Shimada ve Otani (1989), Japon buğday çeşitlerinin, anter kültüründe, kültür ortamının etkisi ve pollen embriyoidlerinden farklılaşan bitkilerin genotiplerinin belirlenmesi amacıyla yaptıkları çalışmalarında, dört çeşidin pollen embriyoidlerini, Patates-2 ve C₁ ortamlarında kültüre almışlar ve her iki ortamda da embriyoidlerin kallus oluşturduğunu gözlemişlerdir. Oluşan kallusları farklılaşma ortamına aktarmışlar ve yeşil ve albino olmak üzere iki tip sürgün elde etmişlerdir. Ayrıca kalluslardan kök oluşumu gözlemlendiğini de belirtmişlerdir.

Aynı çalışmada, ABA'nın 7 çeşidin anter kültürüne olan etkileri üzerinde de durulmuştur. Embriyoid oluşturma yeteneği daha düşük olan çeşitlerde, ABA'nın düşük konsantrasyonlarının teşvik edici, ancak ABA'nın yüksek konsantrasyonlarının engelleyici etki yaptığını saptamışlardır. Genel olarak incelenen tüm çeşitlerde, ABA'nın yeşil bitki farklılaşmasına olan etkisinin teşvik edici olmadığını belirtmişler ve elde ettikleri % 65 haploid bitki ile % 35 diploid bitkinin farklılaşma oranlarının kültür ortamı ile genotiplere bağlı olduğunu kaydetmişlerdir (17).

Zhuang ve ark. (1990), Ayrikotu, buğday ve çavdar hibritlerinin, metafaz ve geç metafazdaki tek çekirdekli anterlerini, 2 mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l kinetin ve % 9 sükroz içeren Patates-2, N₆ ve C₁₇ ortamlarında kültüre almışlar-

dir. Metafazdaki pollenlerin, geç metafazdaki pollenlere göre % 50-100 oranında daha fazla kallus oluşumu gösterdiklerini ve ortamlara göre kallus oluşumunu değerlendirdiklerinde ise Patates-2 ortamında daha yüksek başarı elde ettiklerini belirtmişlerdir. Ayrıca, kışlık çeşitlerin pollenlerinin, yazlık çeşitlerin pollenlerine ve F_2 hibritlerinin, F_1 hibritlerine oranla daha fazla kallus oluşum oranı meydana getirdiği sonucuna varmışlardır (29).

2.3. Olgunlaşmamış Embriyo ve Olgunlaşmış Embriyo

Kültürü Çalışmaları

Ahloowalia (1981): ekmeçlik buğdaydan alınan olgunlaşmamış embriyoların kallusundan, farklılaşan bitkilerin oranını belirlemeye çalışmıştır. *Triticum aestivum*'un, Maris Huntsman çeşidinin, olgunlaşmamış embriyolarını, 0.5 mg/l 2,4-D, 3.2 mg/l IAA ve 1 mg/l kinetin ilavesi yapılmış MS ortamında kültüre almıştır. İki hafta içinde, % 77 oranında kallus oluştuğunu gözlemiştir. Kinetin ilavesi yapılmayan ortamda ise tüm embriyoların kallus oluşturduğunu kaydetmiştir. Ayrıca, farklılaştırma ortamına katılan 1 mg/l NAA'nın kök gelişimini arttırdığını da belirtmiştir (10).

Sears ve Deckard (1981); kışlık buğday çeşitlerinden, 39 genotipin doku kültürüne uygunluğunu denemişlerdir. Bunun için, 12 günlük olgunlaşmamış embriyoları, 1 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında kültüre almışlardır. Oluşan kallusları 0.1 mg/l 2,4-D içeren MS ortamına aktarmışlar ve sürgün

-oluşumu gözlemişlerdir. Bu çalışmalarında, genotipler arasında; kallus oluşum oranları, kallusların nitelikleri, alt kültüre uygunlukları ve farklılaşma oranları açısından farklılıklar olup olmadığını da saptamaya çalışmışlardır. 39 genotipten, 18 genotipin dört alt kültürden sonra bitki oluşturabilme yeteneğinde olduğunu gözlemişlerdir (30).

Papenfus ve Carman (1987): olgunlaşmamış buğday embriyolarının, 2,4-D ve Dicamba (3,6-dichloro-o-anisicacid) ilavesi yapılmış MS ortamında, kallus oluşumu, çimlenme ve sürgün oluşturma durumlarını gözleme amacıyla bir çalışma yapmışlardır. 14 ile 24 günlük embriyoların 2mg/l Dicamba içeren MS ortamında, 2mg/l 2,4-D içeren MS ortamına göre daha fazla kallus oluşturduğunu tespit etmişlerdir (31).

Barabanova ve ark. (1988); 15 melezden, besinin, 14 günlük embriyolarını, 1.5 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında kültüre almışlar ve % 100'e yakın bir kallus oluşum oranı tespit etmişlerdir. Kök ve sürgün gelişiminde, 0.2 mg/l IAA ve 1 mg/l BAP eklenmiş MS ortamının iyi sonuç verdiğini belirtmişlerdir (32).

Batırqozhin (1988). Tselinya 21 varyetesinin olgunlaşmamış embriyolarını, 1 mg/l 2,4-D ve 0.5 mg/l kinetin ilavesi yapılmış MS ortamında kültüre almış ve kallus dokusu elde etmiştir (33).

Liang ve ark. (1988); somaklonal çeşitlerde, olgunlaşmamış embriyolardan oluşturdukları kallusların, oluşum oranlarına ve görünüşlerine göre, en uygun embriyo büyüklüğünü saptamaya çalışmışlar ve 1 mm ile 1.5 mm çapındaki

embriyoların en uygun olduğunu belirtmişlerdir (34).

Çaı ve ark. (1989); kültüre aldıkları olgunlaşmamış buğday embriyolarının, *in vitro*'daki durumları ve uygun embriyo yaşı ile büyüklüğünü saptamaya çalışmışlardır. Kallus oluşum oranındaki ortalama değişimi, % 71-100 arasında bulmuşlar ve bunu genotipler arasındaki farklılıklardan çok çevre koşullarına ve deneysel hatalara bağlamışlardır. Kallustan farklılaşan sürgün oluşumunda ve sürgün sekillenmesindeki değişimin (%0-60) nedenini ise genotipik farklılıklara bağlamışlardır. 0.3 mm ile 1.4 mm büyüklüğündeki embriyoların başarılı sonuçlar vermesine karşın, 1 mm büyüklüğündeki embriyoların, embriyo kültürü için en uygun büyüklük olduğunu saptamışlardır (35).

Schaeffer ve ark. (1979); Kitt, Coker 75-6, Boart, GWO 1809, Arthur 71, Stardard, Olaf ve Centurk buğday çeşitlerinin olgunlaşmış embriyolarını, üç ortamda kültüre almışlar ve kallus oluşumunu gözlemişlerdir. Denemede kullandıkları ortamlar; 0.5 mg/l NAA, 1 mg/l 2,4-D, 1 mg/l kinetin, 50 ml hindistan cevizi sütü, 250 mg maya ekstraktı ve inorganik tuzlar içeren Bloydes (1966) ortamı, 0.1 mg/l 2-İP, 1 mg/l 2,4-D, 1mg/l NAA ve 146 mg/l glutamin ilavesi yapılmış MS ortamı ve 5 mg/l IAA, 0.1 mg/l kinetin, 1 mg/l NAA ve 146 mg/l glutamin ilavesi yapılmış MS ortamlarıdır.

Bu ortamlardan sadece, 0.1 mg/l 2-İP, 1 mg/l 2,4-D, 1 mg/l NAA ve 146 mg/l glutamin ilavesi yapılmış MS (1962) ortamının bir çok çeşit için uygun olduğunu saptamışlardır. Yüksek kallus oluşum oranı ve farklılaşma kapasitesi açısın-

dan "Kitt" buğday çeşidinin, embriyo kültürü çalışmalarında en iyi sonucu verdiğini belirtmişlerdir (23).

3.MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

Çalışmada, Yüzüncü Yıl Üniversitesi üretim alanlarında yetiştirilen, Doğu-88 buğday çeşidinin, yaprak parçaları, anterleri ve embriyoları materyal olarak kullanılmıştır.

3.1.1. Bitkisel Materyaller

3.1.1.1. Yaprak Materyali

1991 ve 1992 yıllarında, buğday bitkisinden bes farklı şekilde eksplant alınmış ve alınan eksplantlar aşağıda belirtilmiştir.

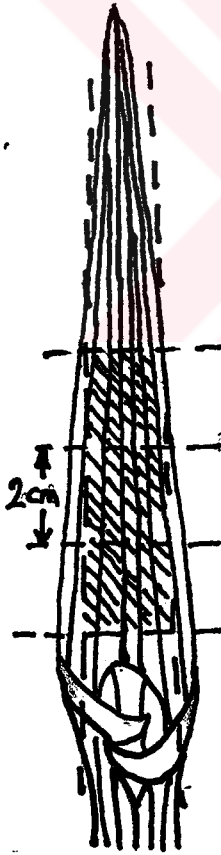
1- Ön çalışmada, tarlada yetiştirilen Doğu-88 buğday çeşidinin, 12 cm uzunluğundaki fidelerinin, yaprak uçları 2 cm'lik bölümler halinde kesilerek materyal olarak kullanılmıştır.

2- Ön çalışmada, bir önceki yılın tohumları, Haziran ayında, Ziraat Fakültesi deneme alanlarından, 4 m²'lik bir alanda, yetiştirilmiş ve fidelerin üç yapraklı olduğu dönemde, alınan yaprakların iki yan kısmı kesilerek, ortadaki bölüm (yaprak ayası) 2 cm'lik parçalar halinde kültüre alınmıştır (Şekil,1).

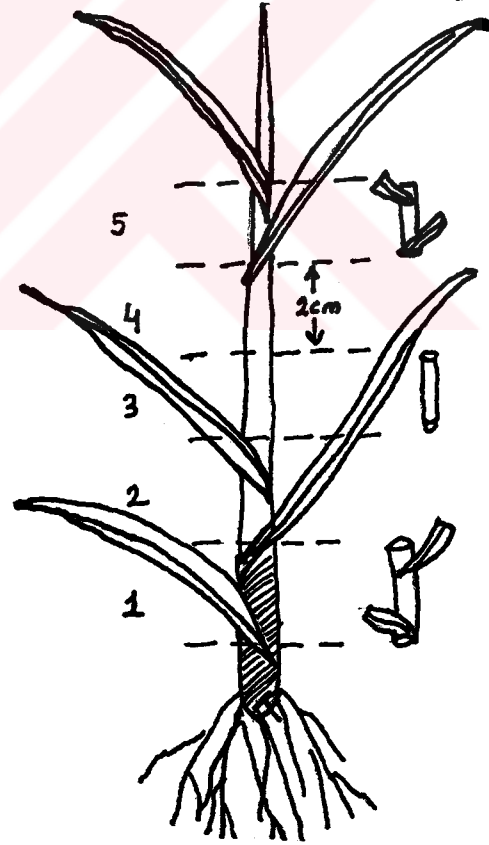
3- İkinci yıl kurulan denemede, tarlada yetiştirilen bitkilerin 12 cm (3 yapraklı) ve 22 cm'lik (4 yapraklı)

fidelerinin (bir hafta arayla), uç kısmından, kök kısmına kadar olan tüm gövdeleri 2 cm'lik parçalar (alınan parçalar; yaprak sapı, yaprak kını, kulakçık, yakacık ve bir kısım yaprak ayası içermistir) halinde kültüre alınmıştır (şekil,2).

4- 1992 yılında, bir önceki yılın tohumları, hormonsuz MS ortamında kültüre alınarak çimlendirilmiş ve bir haftalık fidelerin, kökün hemen üst kısmından, yaprağın koleoptilden çıktığı kısma kadar olan bölümü, 0.5 cm'lik parçalar halinde kültüre alınmıştır (Şekil.3).

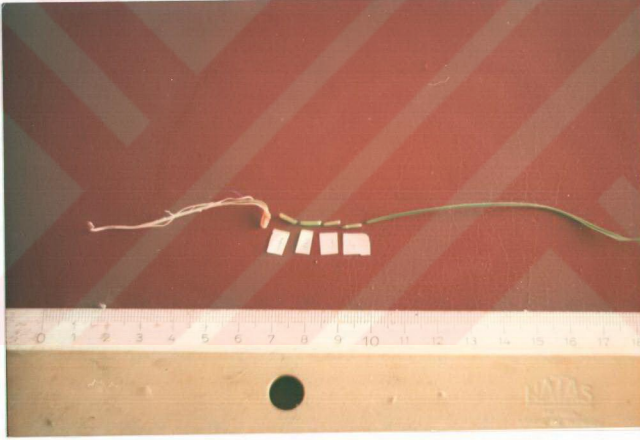


Sekil 1: Kültüre alınan 2 no'lu yaprak materyalinin şematik görünümü



Sekil 2: Kültüre alınan 3 no'lu yaprak materyalinin şematik görünümü

5- En son kültüre alınan yaprak parçalarından, sadece kökün hemen üstündeki 0.5 cm'lik parçaların (Şeki/ 3, 1 nolu bölüm) kallus oluşturması üzerine, hormonsuz MS ortamında yetistirilen fidelerin sadece bu bölümleri ikinci kez kültüre alınmıştır.



Şeki/ 3: Hormonsuz MS (1962) ortamında yetistirilmiş, bir haftalık fidenin, kültüre alınan bölümleri.

3.1.1.2. Anter

Bayrak yaprağından çıkmamış olan buğday başaklarının, orta çiçeklerinden 3'er tane anter, pollenlerinin

tek çekirdekli olduğu dönemin saptanmasından sonra 22.6.1992 tarihinde kültür tüplerine yerleştirilmiştir.

3.1.1.3. Olgunlaşmamış Embriyo

Döllenmeden yaklaşık on gün sonra, embriyoları belirginleşmemiş daneler alınarak, ortadan ikiye kesilmiş ve embriyoyu içeren kısımları kültüre alınmıştır.

8.7.1992'de, döllenmeden iki hafta sonra, 15-16 günlük embriyolar (ort. 2.4 mm çapında) kültüre alınmıştır.

3.1.1.4. Olgunlaşmış Embriyo

18.9.1992 tarihinde, hasat edilen 1992 ürünü Doğu-88 buğdaylarının danelerinden çıkarılan olgunlaşmış embriyolar, dördüncü bitkisel materyal olarak kullanılmıştır.

3.1.2. Kimyasal Materyal

Çalışmada besin ortamı olarak kullanılan temel MS (1962) kültür ortamı, makro ve mikro inorganik elementler ile organik elementler, vitaminler, şeker ve agar içermektedir. Çalışmada MS ortamına üç hormon ile bir amino asit ilavesi yapılmıştır. Çizelge 1'de temel MS (1962) ortamı ve çizelge 2'de de MS ortamına ilave edilen maddeler görülmektedir.

-Çizelge 1: Murashige-Skoog (MS) ortamı (1962)

Ortama katılan maddeler	MS'e göre 1 lt ortama konacak mik. (mg/l)	100 ml stok için gereken miktar (g/100 ml)	Stoktan ortama katılacak mik. (ml/l)
<u>Makro inorganik bileşikler</u>			
H_4NO_3	1650	16.5	10
NO_3	1900	19	10
$aCl_2 \cdot 2H_2O$	440	4.4	10
$gSO_4 \cdot 7H_2O$	370	3.7	10
H_2PO_4	170	1.7	10
<u>Mikro inorganik bileşikler</u>			
a_2EDTA	37.25	0.373	10
$eSO_4 \cdot 7H_2O$	27.85	0.279	10
B_3BO_3	6.2	0.062	10
$nSO_4 \cdot 7H_2O$	22.3	0.223	
$nSO_4 \cdot 7H_2O$	8.6	0.086	
Li	0.83	0.0083	
$a_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25	0.0025	
$uSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025	0.00025	
$oCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025	0.00025	
<u>Organik Bileşikler</u>			
Glycin	2	0.020	10
Nicotinic acid	0.5	0.005	
Trydoksın-HCl	0.5	0.005	
Pyamine-HCl	0.1	0.001	
Ino-inositol	100	1	10
Ükroz	30		
Agar*	7		

*: HI MEDIA, Agar Powder (Purified).

Çizelge 2: Çalışmada temel MS (1962) ortamına ilave edilen maddeler ve miktarları

Maddeler	1lt ortama konulacak mik. (mg/l)	100ml stok için kullanılacak mik. (g/100ml)	Stoktan ortama katılacak mik. (ml/l)
2,4-D	2	0.02	10
Kinetin	1	0.01	10
NAA	1	0.01	10
Asparajin	150	1.5	10

3.2.METOD

3.2.1. Bitkisel Materyallerin Kültüre Alınma Dönemleri

3.2.1.1. Yaprak Parçalarının Kültüre Alındığı Dönem

Yaprak parçalarının kültürü. fide-lerin üç yapraklı olduğu dönemde (20) ve MS ortamında yetiştirilen bir haftalık fidelerden (18) alınan değişik kısımlarla yapılmıştır.

3.2.1.2. Anterlerin Kültüre Alındığı Dönem

Anterler androgenesis için en uygun dönem olan anter pollenlerinin tek çekirdekli olduğu devrede kültüre alınmıştır (23,24,29).Bu devre, anterlerin Darlington tarafından tarif edilen şekilde fikse edilmesi ve Sunderland ve Dunwell (36,37) tarafından tarif edilen şekilde boyanarak mikroskop altında incelenmesi ile saptanmıştır. Bayrak yapraklardan çıkmamış basaklardan alınan anterler, ortadan ikiye kesilmiş ve kesilen bu anterler, üç kısım etil alkol (% 96'lık), bir kısım asetik asit (glasial) içeren solus-

yonda 12 saat bekletilmiştir. Daha sonra, fiksatatiftten çıkarılan anterler, 60°C'ye kadar ısıtılmış, 1 N HCl içinde 5 dakika tutulmuştur. Bu sürenin sonunda, tüp hemen buzlu su bulunan kabın içine daldırılarak soğutulmaları sağlanmıştır. Bu şekilde fikse edilen anterler, feulgen boyasında, 2 saat bekletilmiş, daha sonra: % 50'lik asetik asit ve % 4'lük sulu karmin solusyonu ile hazırlanmış asetokarmin preparatında ezilerek mikroskop altında incelenmiştir.

3.2.1.3. Olgunlaşmamış Embriyoların Kültüre Alındığı

Dönem

Olgunlaşmamış embriyolar döllenmeden 15-16 gün sonra, olgunlaşmamış buğday danelerinden zedelenmeden çıkarılmış ve 30 tane olgunlaşmamış embriyonun çapları ölçülmüştür. Olgunlaşmamış embriyoların çapları, Minitab paket programına göre değerlendirilmiş ve ortalama 2.43 ± 0.0817 mm bulunmuştur.

3.2.2. Bitkisel Materyallerin Sterilizasyonu

Tekrarlanan deneylerde, bütün yaprak parçaları, anterler, olgunlaşmamış ve olgunlaşmış embriyolar; üç kısım su ile sulandırılmış çamasır suyu (% 53'lük Sodyum hipoklorit) içinde 15 dakika bekletildikten sonra, % 96'lık alkolde altı dakika bırakılmış ve üç kez steril destile su ile çalkalanarak sterilize edilmiştir (23).

Olgunlaşmış embriyolar sterilize edildikten sonra, 600 mg/l penisilin ve 250 mg/l streptomisin içeren solusyonda 30 dak. bekletilmiş ve çalkalanmadan kültür tüplerine aktarılmıştır (23).

3.2.3. Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu

Denemede kullanılan cam malzemeler (tüp, beher, petri kapları, balon joje, pipet ve bağetler) ile pens ve bistoriler kullanılmadan önce, saf sudan geçirilip, etüvde 150C'de, 2 saat bırakılarak steril hale getirilmiştir.

3.2.4. Besin Ortamının Hazırlanması ve Sterilizasyonu

Denemede kullanılan ortamlar temel MS ortamına (1962) yapılan ilavelere göre, çizelge 3'de görüldüğü gibi adlandırılmıştır.

Cizelge 3: Temel MS (1962) ortamına eklenen maddeler ile ortam adları.

Ortamlar	Ortam Bileşimleri	ilave edilen madde türü
Ortam-1	MS+2.4-D	O.
Ortam-2	MS+2.4-D+Kinetin	O.+S.
Ortam-3	MS+2.4-D+Kinetin+NAA	O.+S.+O.
Ortam-4	MS+2.4-D+Kinetin+NAA+Asprağın	O.+S.+O.+AA

O: Oksin S: Sitokinin AA: Amino asit

Materyal kısmında verilen ve miktarları belirtilen kimyasal maddelerden çalışmada kolaylık sağlaması açısından stok çözelti hazırlanmıştır. Stok çözeltilerden ortama katılması istenen miktar, 10 ml'lik ve 1 ml'lik pipetler yardımı ile alınarak, 1 lt'lik beherlere aktarılmıştır. Daha sonra beher içindeki çözeltiler, destile su ile litreye tamamlanarak 30 g sükröz ilavesi yapılmıştır. Ortam içindeki sükröz tamamen eritildikten sonra, seyreltilmiş NaOH ve HCl

kullanılarak pH 5.8'e ayarlanmıştır. pH'ı ayarlanan her bir litre ortama 7 g agar katıldıktan sonra, agarın homojen bir şekilde tüm ortam içine dağılarak erimesi için 15 dakika da bir karıştırılarak su banyosunda pisirilmistir. 1 lt'lik her ortamdan, 1. tekerrür için 20. 2. tekerrür için 20 adet 15x2.5 cm boyutlarındaki tüpler içine yaklaşık 25 ml boşaltılmıştır. Tüplerin ağzı pamukla kapatıldıktan sonra, tüpler tüplüklerden alınarak sepetlere yerleştirilmiş ve otoklavda, 120°C, 1 atm basınçta, 20 dak. sterilize edilmiştir.

3.2.5. Bitkisel Materyalin Tüplere Aktarılması

Doku kültürü çalışmalarında, kültüre alınan bitkisel materyallerin ve besin ortamının enfeksiyon alma olasılığı oldukça yüksektir. Bunun için kullanılan malzemelerin ve materyallerin sterilizasyonlarının önemi kadar, kültüre alma esnasında, çevrenin de oldukça temiz, aydınlık ve mikroplardan arındırılmış olması önemlidir. Bu amaçla, kültüre alma işlemine başlamadan önce, kültür odasının tabanı camasır suyu ile yıkanmıştır. Kültüre alma işlemi de, doku kültürü çalışmalarında kullanılan, steril hava akımlı kabinde yapılmıştır.

Steril kabin içine alınan, sterilize edilmiş materyallerin kültürüne, alkol ocağı önünde, pens yardımı ile tüp ağızlarındaki pamukların açılması, materyalin ortam içine yerleştirilmesi ve pamukların yakılarak tekrar sıkıca tüp ağzına kapatılması sureti ile başlanmıştır. Son olarak tüp ağızları 8x8 cm boyutlarındaki alüminyum folyolarla örtül-

-müştür. Bundan sonra tüpler kültür odasına bırakılmıştır.

3.2.6. Kültür Odası Şartları

Kültür odasında gerekli olan ışık, florasan lambalar ile sağlanmıştır. Ortalama ışık miktarı 1500 lux/m^2 dir. 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık fotoperiyodu uygulanmıştır. Sadece yaprak parçalarından 15.10.1992 ve 18.11.1992 tarihinde kültüre alınanlar karanlıkta bırakılmıştır. Denemelerin başladığı Mayıs ayından, denemelerin sona erdiği Aralık ayına kadar olan dönemdeki aylık maksimum, minimum ve ortalama sıcaklıklar tablo 2'de verilmiştir.

Cizelge 4: Mayıs 1992 ile aralık 1992 ayları arasında, kültür odasına ait ortalama, maksimum ve minimum sıcaklıklar (°C).

Aylar	Ort.Sıc.	Maks.Sıc.	Min.Sıc.
Mayıs	20.75	25	16.5
Haziran	26	32	20
Temmuz	28	34	22
Ağustos	26.5	30	23
Eylül	23	28	18
Ekim	24	30	18
Kasım	20	21	19
Aralık	19.5	20	19

Bu dönem içindeki ortalama nispi nem ise % 46'dır.

3.2.7. Denemenin Düzenlenmesi ve Değerlendirilmesi

1991 yılında yaprak parçaları ve olgunlaşmış embriyo ile bir ön çalışma yapılmış, 1992 yılında her dört materyalin kullanılması ile deneme iki tekerrürlü olarak

faktöriyel deneme desenine göre kurulmuş ve değerlendirilmiştir.

Arastırmada kültüre alınan her bir materyal için, her ortandan, iki tekerrürde 40 tüp olmak üzere toplam 160 tüp kullanılmıştır.

Gözlemler, 42 gün (1.5 ay) süresince devam etmiştir. Haftada iki kez yapılan gözlemlerde tespit edilen gelişmeler, düzenli bir şekilde not edilmiştir.

Bulgular kısmındaki tablolarda kullanılan, kallus oluşturma oranlarının (%) hesaplanmasında, aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\begin{array}{l} \text{Kallus} \\ \text{\% 'de Olusum} \\ \text{Oranı} \end{array} = \frac{\text{Kallus olusumu gözlenen tüp sayısı}}{\text{Kültürde kullanılan toplam tüp sayısı} - \text{Enfeksiyon gözlenen tüp sayısı}} \times 100$$

İstatiksel analizlerde, veriler normal dağılım göstermediği ve faktörlerin ortalaması ile varyansı arasında bir ilişki belirlendiği için, veriler $\sqrt{\quad}$ transformasyonuna tabi tutulmuş ve daha sonra faktöriyel deneme desenine göre analiz edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Yaprak Parçalarının Kültüründen Elde Edilen, Kallus, Sürgün ve Kök oluşumları

1991 yılında kurulan ön denemede, Doğu-88 buğday cesidinin 12 cm boyundaki fidelerinin, 2 cm uzunluğundaki yaprak ucu parçaları (yaprak materyali 1), dört ortamda kültüre alınmış ve hiç bir gelişme gözlenmemiştir. Aynı yıl, cimlendirilen buğday tohumları, üç yapraklı dönemde iken, yaprak ayasının orta kısımları (yaprak materyali 2) kültüre alınmıştır. Bu denemenin gözlemleri sonunda da başarı elde edilememiştir. Bunun yanında her iki denemede de oldukça yüksek oranda enfeksiyon tespit edilmiştir. 1 no'lu materyalden ortamlara göre, ortam-1'de %70, ortam-2'de %75, ortam-3'de %67.5 ve ortam-4'de %62.5, 2 no'lu materyalden de ortamlara göre, ortam-1'de %62.5, ortam-2'de %70, ortam-3'de %92.5 ve ortam-4'de %55 enfeksiyon oranları tespit edilmiştir. Bu oranlara göre 1 no'lu materyalde 1. ve 2. ortamlarda, 2 no'lu materyalde ise 3. ve 4. ortamlarda daha yüksek enfeksiyon oranları meydana geldiği görülmektedir.

1992 yılında kurulan ilk denemede, ön çalışmadaki sonuçların olumsuzluğu dikkate alınarak, bitkinin uç kısmından kök kısmına kadar gövde eksenini, 2'şer cm'lik aralıklarla kesilerek kültüre alınmıştır (yaprak materyali 3). Aynı deneme bir hafta sonra 22 cm'lik fideler kullanılarak tekrarlanmıştır. Kurulan her iki denemenin gözlemleri sonunda, yine kallus, sürgün ve kök gelişimi olmamıştır. Ancak, 42

gün sonra bosaltılan tüplerdeki yaprak parçalarının boyları ölçülmüş ve uzama olduğu saptanmıştır. Bu denemelerde, ölçülen ortalama eksplant uzunlukları çizelge 5'de verilmiştir. Çizelgeden de görüleceği gibi 12 cm'lik fidelerden alınan eksplantlarda en fazla uzama ortam-2'de (1.9 cm), 22 cm'lik fidelerden alınan eksplantlarda ise ortam-4'de olmuştur (8.5 mm). Her iki denemede de en az uzama ortam-1'de gerçekleşmiştir (5.8 mm ve 1.3 mm).

Greco ve ark. (1984)'nin yaptıkları bir çalışmaya benzer olarak, hormonsuz MS (1962) ortamında çimlendirilen bir haftalık fide parçaları (yaprak materyali 4) kültüre alınarak, karanlık ortamda bırakılmıştır. Gözlemler sonunda, kökün hemen üst kısmından alınan, 0.5 cm'lik parçaların kallus oluşturduğu, diğer parçaların (şekil-3; 2,3,4 no'lu parçalar) kallus oluşturmadığı saptanmıştır. Ayrıca kültüre alınan bu eksplantlardan kök oluşumu gözlenmemiştir. Elde edilen kallus sayıları ile sürgün sayıları Çizelge 6'da gösterilmiştir.

Çizelgeye göre en yüksek kallus oluşma oranı % 10.5 ile ortam-1'de, sonra sırası ile, % 6.89 ile ortam-4'de, % 4.35 ile ortam-2'de tespit edilmiştir. Ortam-3'de kallus oluşumu gözlenmemiştir. Şekil 4'de ortam-1'de, kökün hemen üst kısmındaki, 0.5 cm'lik parçadan oluşan kallus ve sürgün görülmektedir.

18.11.1992 tarihinde, kallus oluşumunda başarı görülen sadece 1 no'lu parçalar (şekil-3, 1 no'lu parça) kültüre alınarak deneme tekrarlanmıştır.

Cizelge 5: 3 no'lu yaprak materyali ile yapılan kültür sonunda belirlenen ortalama eksplant uzunlukları (cm).*

Ortamlar	12 cm'lik fidelerden alınan yap. eksp.			22 cm'lik fidelerden alınan yap. eksp.		
	1.Tek.	2.Tek.	Ort.	1.Tek.	2.tek.	Ort.
Ortam-1	2.58	2.78	2.68	2.44	2.13	2.29
Ortam-2	3.07	3.09	3.08	2.39	2.43	2.41
Ortam-3	2.69	2.81	2.75	2.35	2.58	2.47
Ortam-4	2.57	2.69	2.68	2.45	2.85	2.65

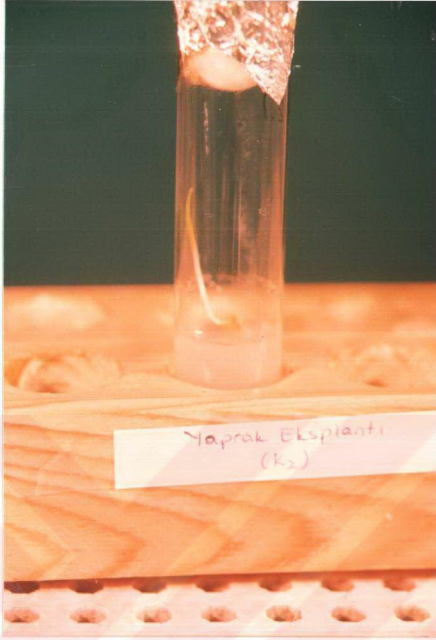
*: Kültüre alınan eksplantların. başlangıçtaki boyları 2 cm.

Cizelge 6: Hormonsuz MS ortamında çimlendirilmiş fidelerden alınan,1,2,3,4 no'lu parçaların kültüründen elde edilen kallus ve sürgün gözlenen tüp sayıları ile kallus oluşum oranları.

		Ortam-1	Ortam-2	Ortam-3	Ortam-4
1. Tek.	Kültüre alınan tüp sayısı	20	20	20	20
	Enfeksiyon alan tüp sayısı	1	13	5	10
	Kallus gözlenen tüp sayısı *	2	-	-	2 (2+1)
	Sürgün gözlenen tüp sayısı **	-	-	-	-
	Kök oluşumu gözlenen tüp sayısı	-	-	-	-
	Kallus oluşum oranı (%)	10.5	0	0	20
2. Tek.	Kültüre alınan tüp sayısı	20	20	20	20
	Enfeksiyon alan tüp sayısı	5	4	5	1
	Kallus gözlenen tüp sayısı *	1 (1+1)	1 (1+1)	-	-
	Sürgün gözlenen tüp sayısı **	2	-	-	-
	Kök oluşumu gözlenen tüp sayısı	-	-	-	-
	Kallus oluşum oranı (%)	6.6	6.25	0	0
Ortalama kallus oluşum oranı (%)		8.82	4.35	0	6.89

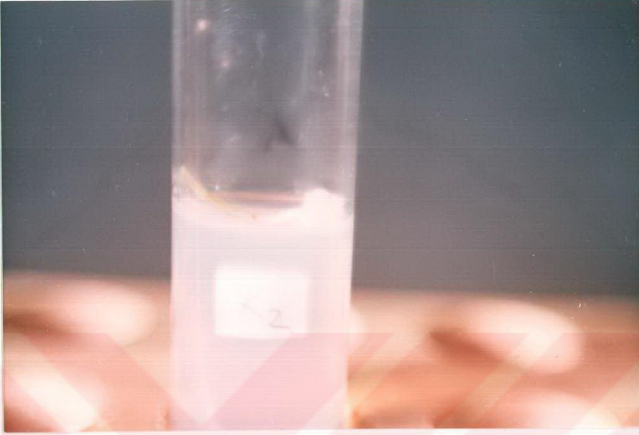
*:Parantez içindeki rakamlardan birincisi kallus, ikincisi aynı tüpte oluşan sürgün sayılarını göstermektedir

**::Sadece sürgün gözlenen tüp sayıları verilmiştir.

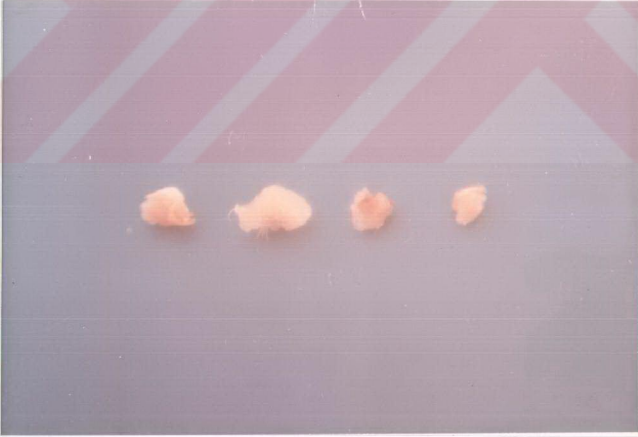


Şekil 4: Hormonsuz MS ortamında yetistirilen bir haftalık fidelerin, kökün üst kısmındaki 0.5 cm'lik parçalarından oluşan kallus ve sürgün.

Kültüre alınan eksplantlar, önce, kesilen her iki yanından uzama göstermiş, daha sonra uzayan kısımlardan birinin ucunda kallus oluşmuştur. Bu denemede elde edilen kallusların çok seffaf, ve kristal görünümde oldukları gözlenmiştir (Şekil 5 ve 6). Yapıları ise, gevşek, sulu ve çok loblu bulunmuştur. Çizelge 7'de bu denemede elde edilen, kallus, sürgün ve kök sayıları ile kallus oluşum oranları, Çizelge 8'de de, kallus oluşum oranlarının en küçük kareler ortalamalarına göre, ortamların çoklu karşılaştırma testi verilmiştir.



Sekil 5: 5 no'lu yaprak materyalinden olusan kallus ve sürgün görünümü



Sekil 6: Sekil 5'deki kallusların, tüpten çıkarıldıktan sonraki görünümleri.

Cizelge 7: Hormonsuz MS ortamında çimlendirilmiş fidelerin, 1 no'lu parçalarının kültüre alınmasından elde edilen kallus, sürgün ve kök sayıları ile kallus oluşum oranları.

		Ortam-1	Ortam-2	Ortam-3	Ortam-4
1. Tek.	Kültüre alınan tüp sayısı	20	20	20	20
	Enfeksiyon alan tüp sayısı	-	-	1	1
	Kallus gözlenen tüp sayısı *	8 (4+4)	-	6 (6+6)	2 (2+2)
	Sürgün gözlenen tüp sayısı **	-	7	1	13
	Kök oluşumu gözlenen tüp sayısı	-	2	1	1
	Kallus oluşum oranı (%)	40	0	31.6	10.5
	2. Tek.	Kültüre alınan tüp sayısı	20	20	20
Enfeksiyon alan tüp sayısı		-	-	-	-
Kallus gözlenen tüp sayısı *		12 (5+5)	1	6 (6+6)	3 (3+3)
Sürgün gözlenen tüp sayısı **		-	6	3	7
Kök oluşumu gözlenen tüp sayısı		5	2	2	1
Kallus oluşum oranı (%)		60	5	30	15
Ortalama kallus oluşum oranı (%)		50	2.5	30.8	12.9

*:Parantez içindeki rakamlardan birincisi kallus, ikincisi aynı tüpte oluşan sürgün sayılarını göstermektedir.

**Sadece sürgün gözlenen tüp sayıları verilmiştir.

Cizelge 7'de görüldüğü gibi kallus oluşum oranları, % 50 ile en iyi ortam-1'de, sonra sırası ile, % 30.8 ile ortam-3'de, % 12.9 ile ortam-4'de ve % 2.5 gibi çok düşük bir oranla da ortam-2'de tespit edilmiştir. İstatistiksel olarak, kallus oluşum oranlarına göre ortamlar arasındaki fark çok önemli bulunmuştur ($F < 0.01$). Kallus oluşum oranlarının en küçük kareler ortalamalarına göre yapılan çoklu karşılaştırma testine göre de (cizelge 8), dört deneme ortamı arasındaki fark önemli bulunmuştur ($P < 0.05$).

Elde edilen kallusların ağırlıklarına göre (cizelge 9), yapılan istatistiksel değerlendirmede, ortamlara ilişkin varyans analizinde ($F > 0.05$) ve en küçük kareler ortalamaları içinde, çoklu karşılaştırma yöntemine göre (cizelge 10), ortamlar arasında önemli bir fark bulunmamıştır ($P > 0.05$).

Cizelge 8: 5 no'lu yaprak materyallerinden oluşan kallusların ağırlıklarının en küçük kareler ortalamalarına göre çoklu karşılaştırma testi.

Ortamlar	\bar{X}	\pm	S \bar{X}
Ortam-1	7.035	\pm	0.682 A
Ortam-2	1.118	\pm	0.682 C
Ortam-3	5.549	\pm	0.682 AB
Ortam-4	3.557	\pm	0.682 BC

($P < 0.05$)

Cizelge 9: 5 no'lu yaprak materyalinin kültürü ile elde edilen kallusların ağırlıkları ile sürgün uzunlukları.

			Ortam-1	Ortam-2	Ortam-3	Ortam4
1. Tek.	Kallus ağı. (g)	max.	0.1511	-	0.0983	0.025
		min.	0.0350	-	0.0134	-
		ort.	0.0700	-	0.0461	0.025
	Sürgün uz. (cm)	max.	11	3	3.5	4.5
		min.	0.5	0.5	0.5	0.5
		ort.	5.6	1.9	2.3	1.7
2. Tek.	Kallus ağı. (g)	max.	0.0617	0.0454	0.0566	0.078
		min.	0.0158	-	0.0310	0.018
		ort.	0.0335	0.0454	0.0433	0.040
	Sürgün uz. (cm)	max.	2.5	2	7	2
		min.	1	0.5	1	0.5
		Ort.	1.7	1	2.6	1.2
Ortalama kallus ağırlıkları (g)			0.0518	0.0454	0.0447	0.0325
Ortalama sürgün uzunlukları (cm)			3.65	1.45	2.45	1.45

Ortamlara göre sürgün oluşturma durumları değerlendirildiğinde, en fazla sürgün oluşumu ortam-3'de gözlenmiştir. En az sürgün oluşumu ise ortam-1'de gerçekleşmiştir. Ortam-2'de kallus oluşan tüplerde sürgün gözlenmemiş, diğer üç ortamda ise aynı tüplerde hem kallus hem de sürgün oluşmuştur. Ortam-1'de sürgün oluşumunun sayıca az olmasına karşın, en uzun sürgün (11 cm) bu ortamda tespit edilmiştir.

Kök oluşumu bakımından ise tüm ortamlarda az sayıda kök oluşmuş ve ortamlar arasında fark gözlenmemiştir.

Cizelge 10: Yaprak materyali-5'deki 1 no'lu eksplanttan oluşan kallusların ağırlıklarına göre, ortamların en küçük kareler ortalamaları ve standart hataları.

Ortamlar	X	±	Sx
Ortam-1	0.0518	± 0.00023	A
Ortam-2	0.0227	± 0.00023	A
Ortam-3	0.0447	± 0.00023	A
Ortam-4	0.0325	± 0.00023	A

(P>0.05)

4.2. Materyal Olarak Anterlerin Kullanıldığı, Deneme Sonuçları

Ön denemede, anterlerin kültüre alındığı dönem (anter mikrosporlarının tek çekirdekli olduğu dönem) kaçırıldığı için, anterlerle bir deneme kurulamamıştır. İkinci yıl, anterlerin tek çekirdekli olduğu dönem saptanmış ve bu dönemdeki anterler kültüre alınmıştır. Diğer üç materyalin kullanıldığı denemelerde, gözlem süresi 42 gün olduğu halde, anterlerde bu süre içinde her hangi bir gelişme gözlenmediğinden, gözlemlere 42 gün daha devam edilmiş ancak, yine bu sürenin sonunda da başarılı sonuca ulaşılmamıştır. Gelişme görülmemesine karşın, kültüre alınan anterlerde, kuruma ve renk değişimi de olmamıştır. Ayrıca çok az sayıda tüpte enfeksiyon tespit edilmiştir. Dört ortamda, iki tekerrürde denenen toplam 160 tüpten, sadece 6 tüpte enfeksiyon gözlenmiş ve enfeksiyon oranı % 3.75 bulunmuştur.

4.3. Olgunlaşmamış Embriyoların Kültüre Alındığı Denemelerde Elde Edilen, Kallus, Sürgün ve Kök oluşumları

Çalışmada, olgunlaşmamış embriyolar, birer hafta ara ile, iki kez kültüre alınmıştır. İlk olarak döllenmeden sonra (9-10 gün), embriyosu henüz tam belirginleşmemiş buğday danelerinin, embriyoyu içeren kısımları kesilerek yarım dane halinde kültüre alınmıştır. Kallus oluşturan danelerin, önce tohum kabuğu (testa) çatlamış ve embriyonun bulunduğu kısım-

da kallus oluşmuştur. İki tekerrürlü olarak, dört ortamda kültüre alınan bu materyalde, kallustan sürgün oluşumu, sadece bir kaç tüpte gözlenmiş, kök oluşumuna ise hiç rastlanmamıştır (çizelge 11). Olgunlaşmamış embriyoların (9-10 günlük) kültüründe belirlenen ve çizelge 11'de verilen sonuçlara göre, kallus oluşum oranları açısından ortamlar arasında istatiki olarak önemli bir fark görülmemiştir. Ancak ortam-4'de bulunan ortalama kallus oluşum oranı (%29.41), diğer üç ortama göre biraz daha yüksek olmuştur. Sürgün oluşumu açısından ortamlar karşılaştırıldığında, ortam-1 ve ortam-4'de çok az sürgün oluşurken, ortam-2 ve ortam-3'de sürgün oluşumuna rastlanmamıştır.

Döllenmeden sonra, yaklaşık 15-16 günlük olgunlaşmamış embriyoların kültüre alındığı denemede, dört ortamda da daha fazla sayıda kallus, sürgün ve kök elde edilmiştir (Çizelge 12). Çizelge'den de görüldüğü gibi dört ortamda da oldukça yüksek kallus oluşum oranları tespit edilmiştir. En yüksek kallus oluşum oranı, ortam-2'de (ort.% 94), sonra sırası ile, ortam-1 (ort.% 84), ortam-3 (ort.% 71) ve ortam-4'de (ort.% 58) gerçekleşmiştir. Kallus oluşum oranlarına göre yapılan istatistiksel analizde (varyans analizi) ortamlar arasındaki fark önemli bulunmuştur. ($F < 0.05$) Kallus oluşum oranlarının en küçük kareler ortalamalarına göre yapılan çoklu karşılaştırma testinde de ortamlar arasındaki fark önemli bulunmuş ($P < 0.05$) ve gruplandırma çizelge 13'de verilmiştir.

Bu materyalden elde edilen kallus ağırlıkları, ortam-

Cizelge 11: 9-10 günlük embriyoların kültüründen elde edilen kallus, sürgün ve kök oluşumu gözlenen tüp sayıları ile kallus oluşum oranları.

		Ortam-1	Ortam-2	Ortam-3	Ortam-4
1. Tek.	Kültüre alınan tüp sayısı	20	20	20	20
	Enfeksiyon alan tüp sayısı	4	3	10	10
	Kallus gözlenen tüp sayısı *	5 (1+1)	4	3	3 (3+3)
	Sürgün gözlenen tüp sayısı **	-	-	-	-
	Kök oluşumu gözlenen tüp sayısı	-	-	-	-
	Kallus oluşum oranı (%)	31.25	23.52	30	30
2. Tek.	Eksplant konan tüp sayısı	20	20	20	20
	Enfeksiyon alan tüp sayısı	3	1	3	13
	Kallus gözlenen tüp sayısı *	3 (1+1)	2	1	2
	Sürgün gözlenen tüp sayısı **	-	-	-	-
	Kök oluşumu gözlenen tüp sayısı	-	-	-	-
	Kallus oluşum oranı (%)	17.7	10.5	8.33	28.57
Ortalama kallus Oluşum oranı (%)		24.24	16.7	18.16	29.41

*: Parantez içindeki rakamlardan birincisi kallus, ikincisi aynı tüpte oluşan sürgün sayılarını göstermektedir.

** : Sadece sürgün gözlenen tüp sayıları verilmiştir.

Cizelge 12: 15-16 günlük embriyoların,kültüründen elde edilen kallus,sürgün ve kök oluşumu gözlenen tüp sayıları ile kallus oluşum oranları.

	Ortam-1	Ortam-2	Ortam-3	Ortam-4	
1. Tek.	Kültüre alınan tüp sayısı	20	20	20	20
	Enfeksiyon alan tüp sayısı	2	4	-	-
	Kallus gözlenen tüp sayısı *	17 (15+12)	15 (15+15)	12 (12+12)	11 (7+7)
	Sürgün gözlenen tüp sayısı **	1	3	-	10
	Kök oluşumu gözlenen tüp sayısı	4	-	4	4
	Kallus oluşum oranı (%)	84	94	60	75
	Ekspiant konan tüp sayısı	20	20	20	20
2. Tek.	Enfeksiyon alan tüp sayısı	-	2	2	2
	Kallus gözlenen tüp sayısı *	15 (7+7)	17 (16+16)	15 (5+5)	11 (2+2)
	Sürgün gözlenen tüp sayısı **	1	-	-	10
	Kök oluşumu gözlenen tüp sayısı	4	1	-	2
	Kallus oluşum oranı (%)	75	94	63	61
Ortalama kallus oluşum oranı (%)	84	94	71	58	

* : Parantez içindeki rakamlardan birinci kallus, ikincisi aynı tüpte oluşan sürgün sayılarını göstermektedir.

** : Sadece Sürgün gözlenen tüp sayıları verilmiştir.

1'de ortalama 0.067g, ortam-2'de ortalama 0.060g, ortam-3'de 0.045g ve ortam-4'de 0.051g olarak bulunmuş ve kallus ağırlıklarına göre (çizelge 14) yapılan istatistiksel analizlerde (varyans analizi ve en küçük kareler ortalamalarına göre çoklu karşılaştırma testi) ortamlar arasında önemli bir fark bulunmamıştır ($P>0.05$) (çizelge 15).

Olgunlaşmamış embriyolardan elde edilen kalluslar, daha sıkı yapıda ve renk bakımından da, beyaz, sarı, kahverengi ve yeşil olmak üzere değişik renklerde bulunmuştur. Şekil 7'de tüpler içinde, dört ortamda oluşan kallusların görünüşleri, şekil 8, 9, 10 ve 11'de de yarımlarındaki embriyolardan oluşan kallusların, tüpler boşaltıldıktan sonraki görünüşleri, verilmiştir.

Çizelge 13: 15-16 günlük embriyolardan elde edilen kallus oluşum oranlarının, en küçük kareler ortalamalarına ilişkin çoklu karşılaştırma testi.

Ortamlar	X	=	Sx	
Ortam-1	9.178	=	0.440	AB
Ortam-2	9.695	=	0.440	A
Ortam-3	8.428	=	0.440	AB
Ortam-4	7.613	=	0.440	B

($P<0.05$)

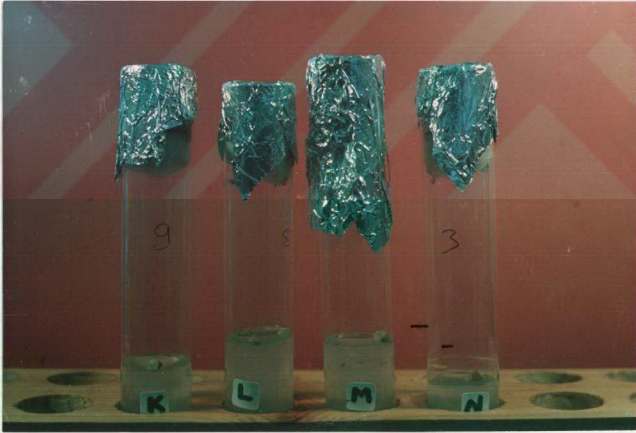
Cizelge 14: 15-16 günlük emriyolardan oluşan kallusların, ağırlıkları ile sürgünlerin uzunlukları.

		Ortam-1	Ortam-2	Ortam-3	Ortam-4	
1. Tek.	Kallus ağı. (g)	max.	0.136	0.114	0.118	0.083
		min.	0.010	0.010	0.008	0.006
		ort.	0.071	0.070	0.0379	0.041
	Sürgün uz. (cm)	max.	9	10	6	15
		min.	0.2	0.2	0.2	0.1
		ort.	2.66	3.44	2.46	3.95
2. Tek.	Kallus ağı. (g)	max.	0.132	0.087	0.156	0.114
		min.	0.010	0.009	0.005	0.018
		ort.	0.063	0.050	0.053	0.060
	Sürgün uz. (cm)	max.	4	11	5.5	8
		min.	0.2	0.1	0.2	0.5
		Ort.	1.59	3.54	2.41	3.28
Ortalama kallus ağırlıkları (g)		0.067	0.060	0.045	0.051	
Ortalama sürgün uzunlukları (cm)		2.13	3.49	2.44	3.62	

Cizelge 15: Olgunlaşmamış embriyolardan (15-16 günlük) oluşan kallus ağırlıklarının, en küçük kareler ortalamaları ve standart hataları.

Ortamlar	X	±	Sx	
Ortam-1	0.0672	±	0.0083	A
Ortam-2	0.0599	±	0.0083	A
Ortam-3	0.0455	±	0.0083	A
Ortam-4	0.0506	±	0.0083	A

($F > 0.05$).



Sekil 7: Dört ortamda 15-16 günlük olgunlaşmamış embriyodan oluşan kallusların tüpteki görünüşleri



Şekil 8: Ortam-1'de 9-10 günlük embriyolardan oluşan kalluslar



Şekil 9: Ortam-2'de 9-10 günlük embriyolardan oluşan kalluslar

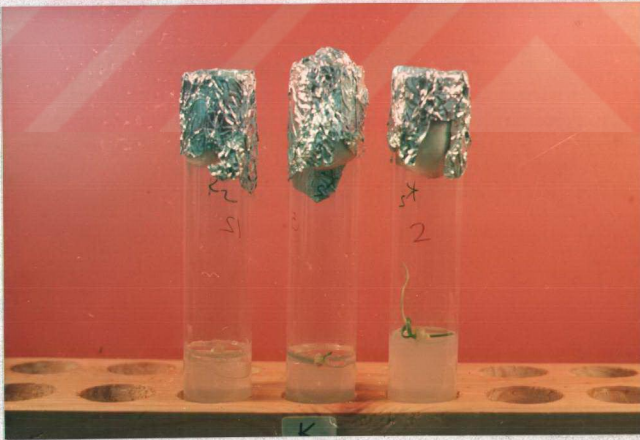


Şekil 10: Ortam-3'de 9-10 günlük embriyolardan oluşan kalluslar

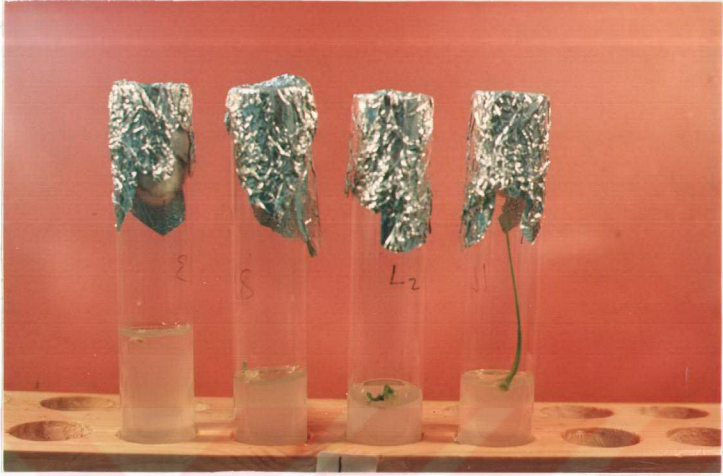


Sekil 11:Ortam-4'de 9-10 günlük embriyolardan oluşan kalluslar

Buğday danelerinden, zedelenmeden çıkarılarak kültüre alınan, 15-16 günlük embriyolardan oluşan kalluslar'da, sekil 12, 13, 14, 15 ve 16'da görülmektedir.



Sekil 12: Ortam-1'de 15-16 günlük olgunlaşmamış embriyodan gelişen kallus ve sürgünlerin görünümü



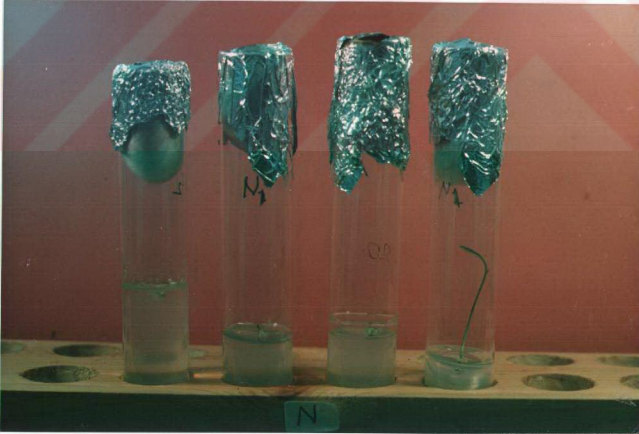
Sekil 13: Ortam-2'de 15-16 günlük olgunlaşmamış embriyo dan gelişen kallus ve sürgünlerin görünümü



Sekil 14: Ortam-2'de 15-16 günlük olgunlaşmamış embriyodan gelişen kalluslar



Şekil 15: Ortam-3'de 15-16 günlük olgunlaşmamış embriyodan gelişen kallus ve sürgünlerin görünümü



Şekil 16: Ortam-4'de 15-16 günlük olgunlaşmamış embriyodan gelişen kallus ve sürgünlerin görünümü

4.4. Olgunlaşmış Embriyoların Kültüründen Elde Edilen Kallus, Sürgün ve Kök Olusumları

Olgunlaşmış embriyolar, 1. ve 2. yıl olmak üzere iki kez kültüre alınmıştır. Her iki yılın deneme sonuçları da, oldukça başarılıdır. İlk yıl kurulan ön denemede, ortam-2'de her iki tekrerrürde de % 100 kallus olusum oranı tespit edilmiştir. Tüm ortamlarda oluşan kallus oranları ile sürgün ve kök sayıları çizelge 16'da verilmiştir. Çizelgeden de görüldüğü gibi, Ortam-2'den sonra sırasıyla, ortalama % 97 gibi yüksek bir oranınla ortam-1, ortalama %76.6 oranı ile Ortam-4 ve ortalama % 76.47 oranı ile de ortam-3 gelmektedir. Ayrıca, hem sürgün olusumlarına hem de kök olusumları bakımından diğer üç materyale göre en iyi sonuçlar, olgunlaşmış embriyodan elde edilmiştir. Sürgün sayıları ortamlara göre karşılaştırıldığında, ortam-1'de toplam 26, ortam-2'de toplam 29, ortam-3'de toplam 27 ve ortam-4'de toplam 25 sürgün sayısı elde edilmiş ve ortamlar arasında farklılık görülmemiştir. Kök sayıları bakımından, ortam-2'de toplam 27 ile en yüksek kök olusumu gözlemlenmiştir. Diğer ortamlarda oluşan kök sayıları da birbirine yakın bulunmuştur (14,15 ve 19).

Olgunlaşmış embriyo kültürüne ait ikinci yılın sonuçları çizelge 17 'de görülmektedir. Bu deneme sonuçları da oldukça yüksek bulunmuştur. İlk yılın sonuçları ile karşılaştırıldığında, yıllar arasındaki fark istatistiksel açıdan çok önemli çıkmıştır ($F < 0.01$). En yüksek kallus olusum oranı, ortam-1'de ortalama %93, ortam-2'de ortalama % 84,

Cizelge 16: Ön denemede, olgunlaşmış embriyolardan elde edilen kallus, sürgün ve kök oluşumu gözlenen tüp sayıları ile kallus oluşum oranları.

	Ortam-1	Ortam-2	Ortam-3	Ortam-4	
1. Tek.	Kültüre alınan tüp sayısı	20	20	20	20
	Enfeksiyon alan tüp sayısı	2	5	3	6
	Kallus gözlenen tüp sayısı *	18 (14+14)	15 (13+13)	12 (10+10)	9 (9+9)
	Sürgün gözlenen tüp sayısı **	-	-	5	2
	Kök oluşumu gözlenen tüp sayısı	9	14	8	5
	Kallus oluşum oranı (%)	100	100	71	64
	2. Tek.	Ekspiant konan tüp sayısı	20	20	20
Enfeksiyon alan tüp sayısı		3	4	3	4
Kallus gözlenen tüp sayısı *		16 (11+11)	16 (16+16)	14 (10+10)	14 (12+12)
Sürgün gözlenen tüp sayısı		1	-	2	2
Kök oluşumu gözlenen tüp sayısı		5	13	7	13
Kallus oluşum oranı (%)		94	100	82	88
Ortalama kallus oluşum oranı (%)		97	100	76	77

*:Parantez içindeki rakamlardan birincisi kallus, ikincisi aynı tüpte oluşan sürgün sayılarını göstermektedir.
**:Sadece sürgün gözlenen tüp sayıları verilmiştir.

Cizelge 17: ikinci yıl Olgunlaşmış embriyoların kültüründen elde edilen, kallus, sürgün ve kök oluşumu gözlenen tüp sayıları ile kallus oluşum oranları.

		Ortam-1	Ortam-2	Ortam-3	Ortam-4
1. Tek.	Kültüre alınan tüp sayısı	20	20	20	20
	Enfeksiyon alan tüp sayısı	4	6	1	-
	Kallus gözlenen tüp sayısı *	14 (9+9)	12 (9+9)	8 (8+8)	7 (6+6)
	Sürgün gözlenen tüp sayısı **	4	3	4	7
	Kök oluşumu gözlenen tüp sayısı	4	6	4	8
	Kallus oluşum oranı (%)	88	86	42	35
2. Tek.	Eksplant konan tüp sayısı	20	20	20	20
	Enfeksiyon alan tüp sayısı	8	3	3	4
	Kallus gözlenen tüp sayısı *	12 (7+7)	14 (13+13)	9 (9+9)	2 (2+2)
	Sürgün gözlenen tüp sayısı **	2	4	2	7
	Kök oluşumu gözlenen tüp sayısı	2	5	4	6
	Kallus oluşum oranı (%)	100	83	53	13
Ortalama kallus oluşum oranı (%)		93	84	47	25

*: Parantez içindeki rakamlardan birincisi kallus, ikincisi aynı tüpte oluşan sürgün sayılarını göstermektedir.

** : sadece sürgün gözlenen tüp sayıları verilmiştir.

ortam-9'de ortalama % 47 ve ortam-4'de ortalama % 25 olarak bulunmuştur. İlk yılda elde edilen kallus oluşum oranları ile ikinci yıl elde edilen kallus oluşum oranlarının ortalamalarına göre, oranlar, ortam-1'den, ortam-4'e doğru azalma göstermiştir (ort.%95, ort.%92, ort.%61.5 ve ort.%51). İstatiki olarak ortamlar arasındaki fark çok önemli bulunmuştur ($F < 0.01$). Kallus oluşum oranlarının en küçük kareler ortalamalarına göre yapılan çoklu karşılaştırma testinde de ortamlar arasındaki fark önemli bulunmuştur (çizelge 18). İki yılın sonuçlarının karşılaştırılmasında da ortamlar arasındaki fark istatiki olarak çok önemli bulunmuştur ($F < 0.01$).

Sürgün ve kök sayıları bakımından, ortam-1'de 22 sürgün, 6 kök, ortam-2'de 29 sürgün, 11 kök, ortam-3'de 23 sürgün, 8 kök ve ortam-4'de de 22 sürgün 14 kök elde edilmiştir. Sürgün ve kök gelişimi açısından ortamlardan elde edilen sonuçlar birbirine yakın olduğu için, ortamlar arasında fark gözlenmemiştir.

İkinci yıl, olgunlaşmış embriyolardan oluşan kallus ağırlıkları ile sürgün uzunlukları, çizelge 19'da verilmiştir. Kallus ağırlıklarına göre iki yılın sonuçlarının istatistiksel değerlendirmelerinde yıllar arasındaki fark önemli bulunmuştur ($P < 0.05$). Ortam ve yıl etkilerine göre kallus ağırlıklarının, en küçük kareler ortalamalarına göre gruplandırılmaları da Çizelge 20'de gösterilmiştir. Kallus ağırlıklarının istatistiksel analizinde, ortam-2'de oluşan kallus ağırlıkları (ort. 0.120g) ile ortam-1 (ort. 0.078g) ve ortam-4'de (ort. 0.042g) oluşan kallus ağırlıkları ara-

Cizelge 18: Olgunlaşmış embriyolardan elde edilen kallus oluşum oranlarının en küçük kareler ortalamalarına ilişkin çoklu karşılaştırma testi.

Ortamlar	\bar{X}	\pm	$S\bar{X}$	
Ortam-1	9.769	\pm	0.582	A
Ortam-2	9.596	\pm	0.582	AB
Ortam-3	7.811	\pm	0.582	BC
Ortam-4	6.726	\pm	0.582	C

(P<0.05)

Cizelge 19: Olgunlaşmış emriyolardan oluşan kallusların, max., min. ve ort. ağırlıkları ile sürgünlerin, max., min. ve ort. uzunlukları

			Ortam-1	Ortam-2	Ortam-3	Ortam4
1. Tek.	Kallus ağı. (g)	max.	0.170	0.161	0.155	0.067
		min.	0.032	0.042	0.086	0.020
		ort.	0.094	0.106	0.121	0.044
	Sürgün uz. (cm)	max.	16.5	16	14	13
		min.	0.5	2	0.5	0.1
		ort.	3.43	8.55	4.31	4.32
2. Tek.	Kallus ağı. (g)	max.	0.104	0.133	0.188	0.040
		min.	0.027	0.132	0.028	0.040
		ort.	0.062	0.133	0.108	0.040
	Sürgün uz. (cm)	max.	6.5	14	13.5	11
		min.	0.1	0.2	0.5	0.2
		Ort.	2.81	3.92	5.32	3.88
Ortalama kallus ağırlıkları (g)			0.078	0.120	0.115	0.042
Ortalama sürgün uzunlukları (cm)			3.12	6.24	4.82	4.1

Çizelge 20: Olgunlaşmış embriyolardan oluşan kallusların ağırlıklarının, ortam ve yıllara göre, en küçük kareler ortalamaları ve standart hataları (Çoklu karşılaştırma yöntemine göre).

Ortamlar	X ± Sx		Yıl	X ± Sx	
Ortam-1	0.137 ± 0.067	B	1	0.414 ± 0.047	A
Ortam-2	0.427 ± 0.067	A	2	0.088 ± 0.047	B
Ortam-3	0.243 ± 0.067	AB			
Ortam-4	0.198 ± 0.067	B			

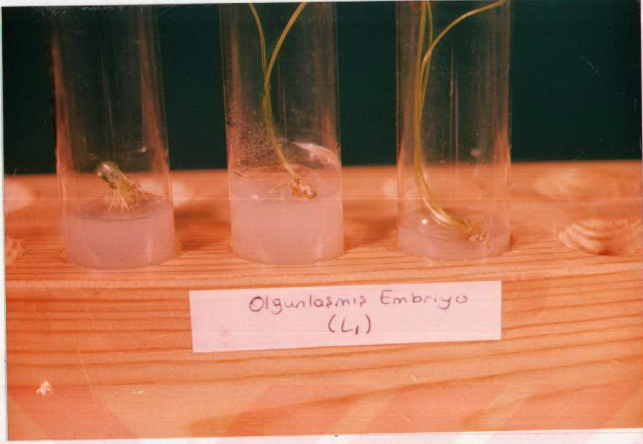
(P<0.05).

sındaki farkın önemli olduğu bulunmuştur ($P < 0.05$). Ortam-3'de oluşan kallus ağırlıklarının (ort. 0.115g) diğer ortamlar arasındaki farkı ise önemsizdir. Bu sonuca göre en ağır kalluslar ortam-2'de olmuştur.

Kalluslar yapıları bakımından, olgunlaşmamış embriyolardan oluşan kalluslarla aynı nitelikleri göstermiştir. Sıkı, az boğumlu ve beyazdan, kahverengiye kadar değişen renklerde kalluslar elde edilmiştir. Şekil 17, 18, 19 ve 20'de, olgunlaşmış embriyolardan oluşan kallus, sürgün ve kökler görülmektedir. Bazı enfeksiyonlu tüplerde de kallus ve sürgün oluşumları gözlenmiştir (resim 21).

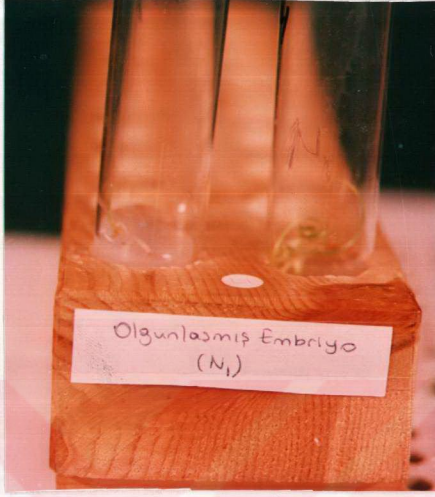


Şekil 17: Ortam-1'de olgunlaşmış embriyo kültüründen oluşan kallus, sürgün ve köklerin görünüşleri

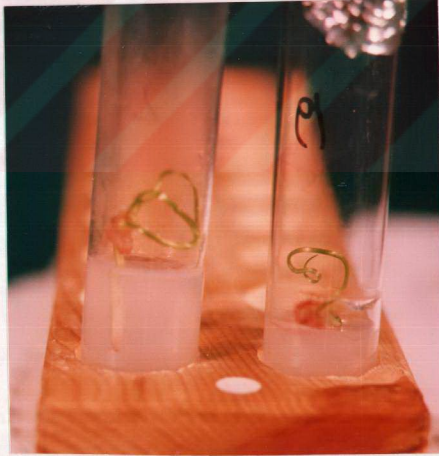


Sekil 18: Ortam-2'de olgunlaşmış embriyo kültüründen oluşan kallus, sürgün ve köklerin görünümleri.

Sekil 19: Ortam-3'de olgunlaşmış embriyo kültüründen oluşan kallus, sürgün ve köklerin görünümleri.



Sekil 20: Ortam-4'de Olgunlaşmış embriyo kültüründen oluşan kallus, sürgün ve köklerin görünümü.



Sekil 21: Olgunlaşmış embriyolardan oluşan kallusların, enfeksiyonlu tüplerdeki görünümü.

4.5. % Kallus Olusum Oranlarına Göre Ortamların Değerlendirilmesi

Kallus oluşum oranlarına göre, ortamlara ilişkin varyans analizinde, ortamlar arasındaki fark çok önemli bulunmuştur ($F < 0.01$) (çizelge 21). Dört değişik ortama ilişkin kallus oluşum oranlarının, en küçük kareler ortalamalarına göre yapılan çoklu karşılaştırma testinde de ortam-1'in (%81) ortam-2 (%70.13) ve ortam-4 (%43.23) arasındaki farkın önemli olduğu bulunmuştur (çizelge 22). Bu istatistiksel sonuçlara göre, üç bitkisel materyalden de (yaprak parçaları %24.05, olgunlaşmamış embriyo %76.75 ve olgunlaşmış embriyo %74.9), en yüksek kallus oluşum oranı ortam-1'de elde edilmiştir. Kallus oluşum oranlarına göre, ortamların durumları şekil 22'de görülmektedir.

4.6. Kallus Ağırlıklarına Göre Ortamların Değerlendirilmesi

Kallus ağırlıklarına göre, ortamlara ilişkin varyans analizinde, ortamlar arası farkın önemli olmadığı çizelge 23'den görülmektedir. Ancak, dört değişik ortama ilişkin en küçük kareler ortalamalarına göre yapılan çoklu karşılaştırma testinde, ortam-2'nin, ortam-1 ve ortam-4 ile arasındaki farkın önemli olduğu bulunmuştur (Çizelge 24). Bu değerlendirmeye göre, ortam-2'den elde edilen kallus ağırlıkları (0.0751g), ortam-1 (0.0656g) ve ortam-4'den (0.0418g) elde edilen kallus ağırlıklarına göre daha ağır bulunmuştur. Ortam-2 ve ortam-3 arasındaki fark ise önemsizdir ($P > 0.05$). Ortamlara göre her bir eksplantta belirlenen

Çizelge 21: Kallus oluşum oranlarına göre, ortamların varyans analiz tablosu.

Varyasyon Kaynakları	SD	KT	KO	F
Ortam	3	0.757	0.252	5.6**
Eksplant	2	3.108	1.554	34.51**
OrtamxEksp.	6	2.225	0.371	8.24**
Yıl	1	0.173	0.173	3.84*
Hata	19	0.856	0.045	
Genel	31	7.118		

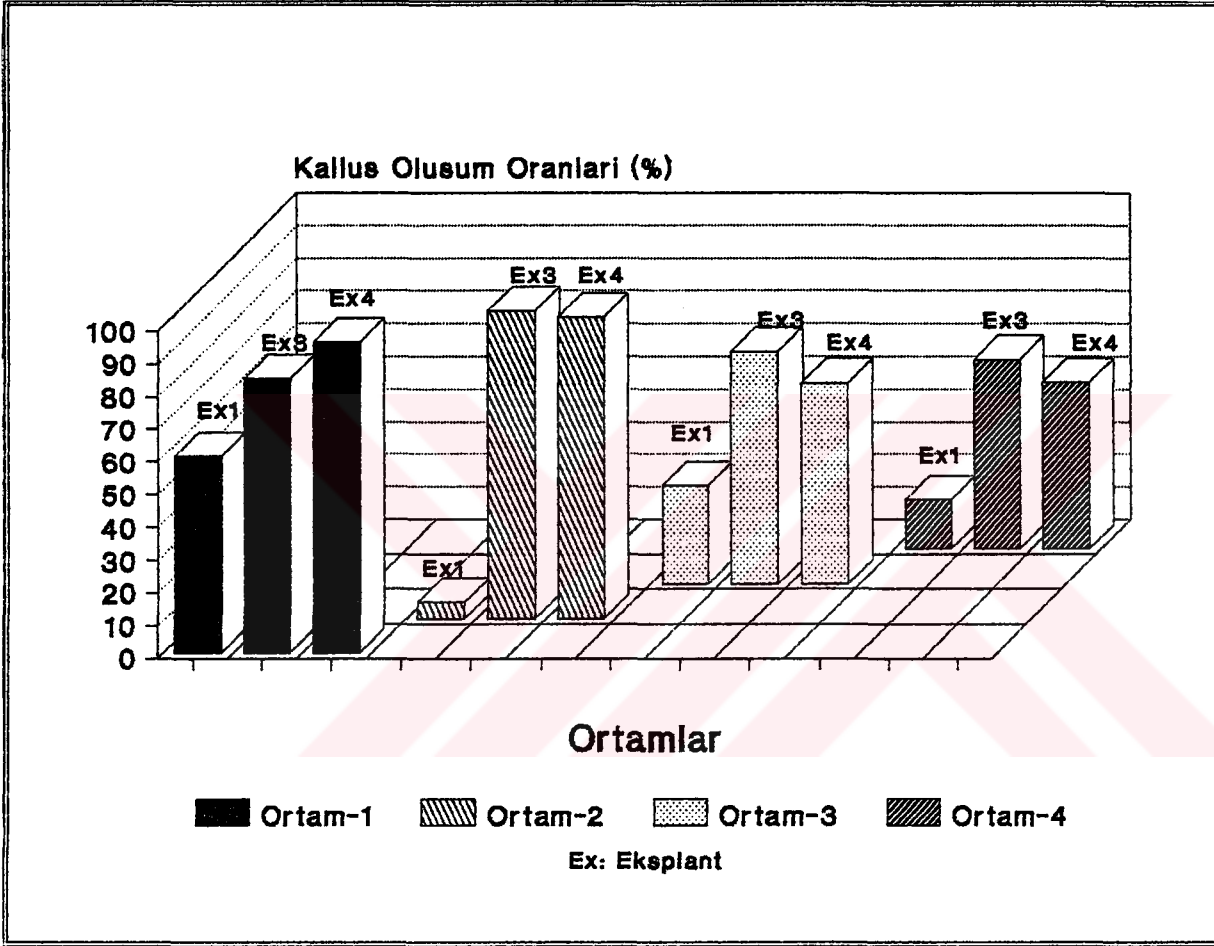
*: $F < 0.05$

** : $F < 0.01$

Çizelge 22: Kallus oluşum oranlarının en küçük kareler ortalamaları içinde, ortamlara göre çoklu karşılaştırma testi.

Ortamlar	\bar{X}	\pm	$S\bar{X}$	
Ortam-1	1.896	\pm	0.087	A
Ortam-2	1.532	\pm	0.087	B
Ortam-3	1.728	\pm	0.087	AB
Ortam-4	1.525	\pm	0.087	B

($P < 0.05$)



Ex1: Yaprak parçaları Ex3: Olgunlaşmamış embriyo

Ex4: Olgunlaşmış embriyo

Şekil 22: Ortamlara ve eksplantlara göre kallus oluşum oranları

kallus ağırlıkları şekil 23'de gösterilmiştir.

Cizelge 23: Üç bitkisel materyalden elde edilen kallus ağırlıklarının, ortam, eksplant, ortam x eksplant ve yıl kaynaklarına göre, varyans analiz tablosu.

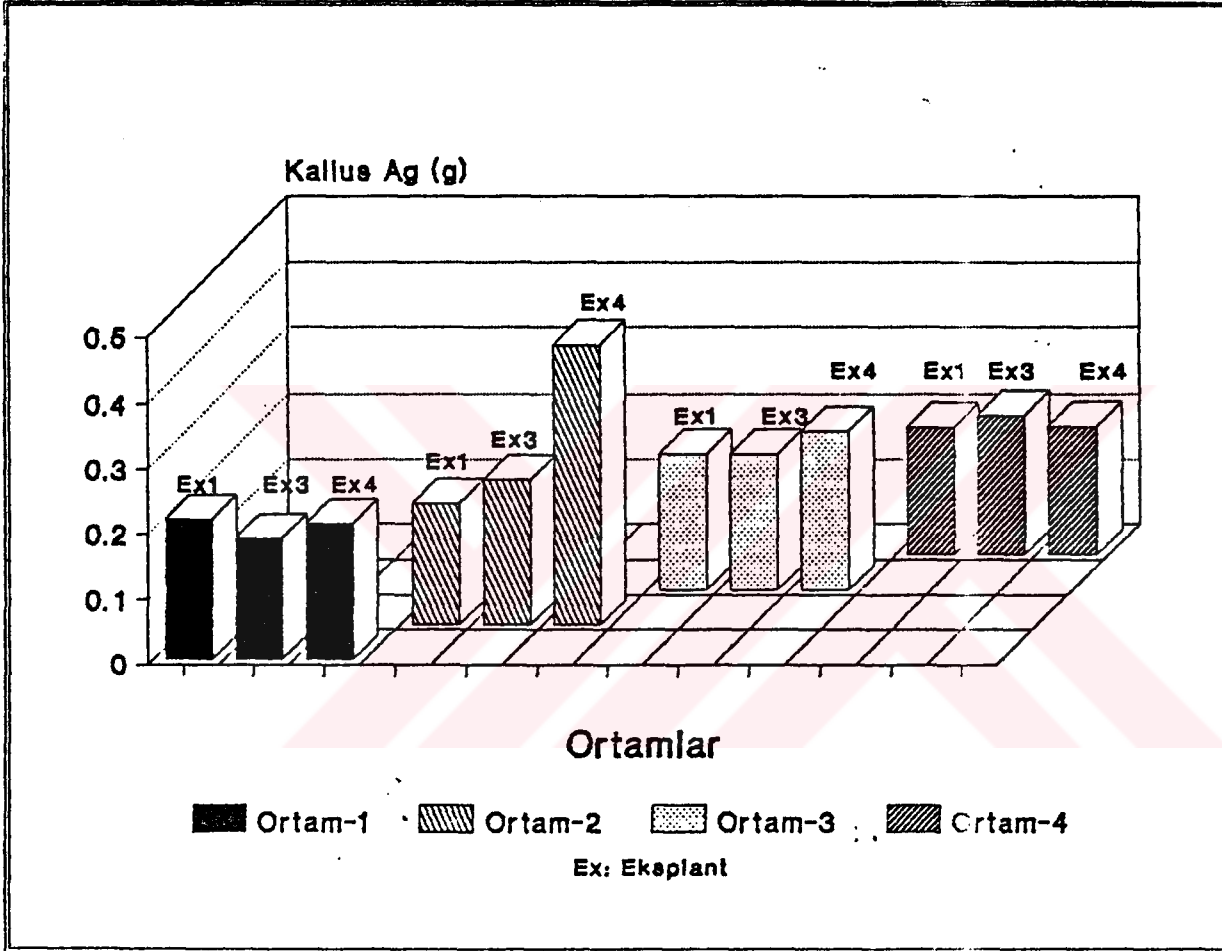
Varyasyon Kaynakları	SD	KT	KO	F
Ortam	3	0.008	0.003	1.01
Eksplant	2	0.005	0.002	0.85
Ortam x Eksplant	6	0.029	0.005	1.81
Yıl	1	0.134	0.134	49.56**
Hata	19	0.051	0.003	
Genel	31	0.351		

**F<0.01

Cizelge 24: Kallus ağırlıklarının en küçük kareler ortalamalarına göre, ortamların çoklu karşılaştırma testi.

Ortamlar	X	±	Sx	
Ortam-1	0.19	±	0.04	B
Ortam-2	0.28	±	0.04	A
Ortam-3	0.22	±	0.04	AB
Ortam-4	0.20	±	0.04	B

(P<0.05).



Ex1: Yaprak parçaları Ex3: Olgunlaşmamış embriyo

Ex4: Olgunlaşmış embriyo

Şekil 23: Ortamlara ve eksplantlara göre ortalama kallus ağırlıkları

TARTIŞMA

Doğu-88 buğday çeşidinden alınan dört değişik bitki materyalinden kallus oluşumu için test edilen, dört farklı ortandan en uygun olanının saptanması amacı ile yapılan bu çalışmada, kültüre alınan eksplantlardan elde edilen kallus oluşum oranları ve kallus ağırlıkları ile sürgün uzunlukları ve kök gelişmesi tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu bölüm, çalışmada kullanılan bitkisel materyallere göre dört başlık altında toplanmış ve araştırmada elde edilen sonuçlar ile benzer araştırma sonuçları karşılaştırılmış, ortaya çıkan farklılıklar tartışılmıştır.

5.1. Yaprak Rarçası Kültürü

Yaprak eksplantı ile yapılan çalışmalarda, materyal, doğal koşullar altında ve yapay besin ortamında olmak üzere, iki farklı ortamda yetişen bitkilerden alınmış ve doğal koşullarda yetişen bitkilerden alınan materyallerden kallus oluşumu gözlenmemiştir. Prilyuk (1988) ise, yaptığı iki ayrı araştırmada, tarlada yetişen bitkilerden aldığı eksplantlarla oldukça yüksek kallus oluşum oranı tespit ettiğini belirtmiştir. Bu çalışmada, tarladan alınan eksplantlarla kurulan denemede başarısız olunmuştur. Bunu etkileyen faktörlerin, bitki materyalinin alındığı bitkinin fizyolojik durumu, yetiştirme koşulları ve yine başlangıç materyali olan bitkinin aktif büyüme başlangıcında olup olmaması (1), çevre koşulları (sıcaklık, nem, aydınlık ve karanlıkta kültüre alma, ışık şiddeti ve uygulanan foto periyot) (13), ile genetiksel özellikler (21) olabileceği

belirtilebilir. Etkili olan diğerk bir faktör, Greco ve ark. (1984) tarafından da belirtildiği gibi, tahıl türlerinde, sadece meristematik hücrelerin kallus üretebilmesidir. Tahıllarda meristematik hücre içeren kısımların belirlenmesinin güçlüğünden dolayı, bitkiden alınan parçaların meristematik hücre içerme olasılığı düşmekte ve buna bağlı olarak, kallus oluşum oranları da azalmaktadır. Bu araştırmada, Greco ve ark. (1984)(18) tarafından uygulanan ve başarılı sonuçlar alınan yöntemle benzer şekilde, hormonsuz MS ortamında yetişen bir haftalık fidelerden alınan eksplantlar ile dört ortamda da başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Organ kültürlerinde, organize olmuş meristemler, hormon oluşumunun merkezi olduğu için, kültür ortamına hormon ilave edilmesine gerek duyulmamaktadır. Ancak, kallus kültürlerinde, parankimatik dokular hormon sentezi yapamadıkları için, kültür ortamına hormon ilave edilmesi mutlak gerekli görülmektedir (1). Bu nedenle, çalışmada, ele alınan dört ortama da 2 mg/l 2,4-D ilavesi yapılmıştır. Literatür bildirişlerine göre (18,19,20,22), 2,4-D'nin varlığı, yaprak eksplantlarından kallus oluşumu için temel olarak gösterilmektedir. Kültür ortamı olarak kullanılan temel MS ortamına (18,19,20) 2,4-D ilavesinin yanında, kinetin, NAA ve asparajin'de eklenmiştir. Kallus ağırlıklarına göre yapılan istatistiksel analiz sonucunda, dört ortam arasında önemli bir fark bulunmadığından, ilave edilen maddelerin kallus ağırlıklarına olan etkileri bakımından, birbirlerinden farklı olmadıkları söylenebilir. Kallus oluşum oranları açısından ortamların

~~karşılaştırılmasında~~, sadece 2,4-D içeren ortam-1'in, diğer ortamlara göre daha yüksek kallus oluşum oranı gösterdiği belirtilebilir. Elde edilen bu sonuç, birçok araştırma sonuçları ile benzerdir (18,19,20,22).

Denemede, yaprak eksplantlarından elde edilen kallusların, diğer materyallerden elde edilen kalluslara göre, daha yumuşak, çok boğumlu, gevşek ve şeffaf yapıda oldukları gözlenmiştir. Tuberosa ve ark.(1988)(13), MS (1962) ve Gamborg's B5 (1968) ortamlarında kültüre aldıkları yaprak parçalarından iki tip kallus üretmişler, MS ortamında elde ettikleri kallusların yapısı ile bu çalışmada elde edilen kallusların yapısı benzerlik göstermiştir.

5.2. Anter Kültürü

Anter kültüründe, başarıyı etkileyen faktörlerin en başında, anterlerin alındığı dönem gelmektedir. Bunun için en uygun dönem, çeşitli araştırmacılar tarafından belirtildiği gibi (23,24,29,37). anter mikrosporlarının tek çekirdekli olduğu dönemdir. Çalışmada, Doğu-88 buğday çeşidinin, henüz bayrak yapraktan çıkmamış başaklardaki anterlerin, tek çekirdekli dönemde olduğu saptanmış ve bu dönemdeki anterler kültüre alınmıştır. 160 tüpte kültüre alınan, toplam 480 anterde, kallus oluşumu gözlenmemiştir. Schaeffer ve ark. (1979), kültüre aldıkları 1411 anterden, sadece 60 anterin, % 4.2 gibi çok düşük oranda kallus oluşturduğunu kaydetmişlerdir (23). Tahıllarda, anter kültüründe başarı oldukça düşüktür. Buradan, kültüre alınan sadece 480 anter ile başarı elde etme şansının az olduğu ortaya çıkmaktadır.

Bu faktörün dışında; anter alınan bitkilerin fizyolojik durumlarının, genotipin, anterlerin kültüre alınmadan önce, belli bir süre, düşük veya yüksek sıcaklık şokuna tabi tutulmasının, ortam farklılıklarının (24,26) çevre koşullarının (sıcaklık, ışık, nem) (26) ve bitkinin yazlık veya kışlık çeşit olmasının (29) anter kültürüne olan etkileri çeşitli araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur. Bu çalışmada kültüre alınan anterler herhangi bir fiziksel muameleye tabi tutulmamıştır. Başarıyı arttıran bir faktör olan böyle bir uygulamanın yapılmamış olması da, anterlerden düşük oranda gerçekleşen gelişimin görülmemesine bir neden olarak gösterilebilir.

5.3. Olgunlaşmamış Embriyo Kültürü

2.43 mm çapındaki olgunlaşmamış embriyoların kullanıldığı denemede, 4 farklı ortamda, % 58-94 oranları arasında kallus oluşumu tespit edilmiştir. Ahloowalia(1981), olgunlaşmamış embriyoları, 2,4-D, IAA ve kinetin ilavesi yapılmış MS ortamında kültüre almış ve % 77 oranında kallus oluşumu tespit etmiştir. İki çalışmada da elde edilen oranların birbirine yakın olduğu görülmektedir. Bu çalışma da kullanılan embriyolar 15-16 günlük idi. Çeşitli araştırmacılar yaptıkları olgunlaşmamış embriyo kültürlerinde, 12 günlük (30), 14-24 günlük (31), 14 günlük (32) embriyolar olmak üzere, farklı büyüklükte olan olgunlaşmamış embriyoları kültüre almışlar ve başarılı sonuçlar elde etmişlerdir. Bu çalışmada 15-16 günlük embriyolar kültüre alınmış ve materyalin yaşı ile elde edilen sonuçlar diğer çalışmalarla

benzerlik göstermiştir.

Olgunlaşmamış embriyo kültüründe, uygun embriyo büyüklüğünün tespiti için yapılan çeşitli çalışmalarda, 1mm ile 1.5 mm çapındaki embriyoların uygun olduğu belirtilmesine karşın (34,35), bu çalışmada kullanılan 2.43 ± 0.0817 mm çapındaki embriyolardan da başarılı sonuçlar alınmıştır.

Söz konusu bu çalışmada, kallus ağırlıklarına göre yapılan istatistiksel değerlendirmede, dört kültür ortamının, birbirinden farklı olmadığı ortaya konmuştur. Bu konuda yapılan benzer çalışmalarda, kallus oluşumu için, MS kültür ortamına; 2,4-D, IAA, kinetin ve dicamba ilave edilmesinin olumlu olduğu belirtilmiştir (10,30,31,32,33). Ayrıca, Papefus ve Carman (1987), MS kültür ortamına 2mg/l dicamba ilavesinin, 2 mg/l 2,4-D ilavesinden daha iyi sonuç verdiğini belirtmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarından MS ortamına katılan 2,4-D ve kinetinin, olgunlaşmamış embriyodan elde edilen kallus oluşumunda olumlu etki yaptığı (2,4-D ilavesi yapılan ortamdan % 84, 2,4-D ile birlikte kinetin ilavesi yapılan ortamdan da % 94 kallus oluşum oranları tespit edilmiştir) ve diğer bazı araştırma sonuçları ile uyumlu olduğu, bunun yanında, NAA ve asparajinin de, diğer iki madde gibi olumlu etki gösterdiği belirtilebilir.

Temel MS ortamına, kinetin ilavesi yapılan ortam-2'nin, 2,4-D ve asparajin ilavesi yapılan ortamlar ile, sürgün oluşumu bakımından önemli bir fark göstermemesine karşın, NAA içeren ortama göre, daha fazla sayıda sürgün oluşturduğu tespit edilmiştir. Kök oluşumunda, 2,4-D, kinetin ve aspara-

jinin kök oluşumunu teşvik ettiği, NAA'nın etkisinin ise belirlenemediğini belirtilebilir. Ahloowalia (1981) ise MS ortamına 1mg/l NAA ilavesinin kök gelişimini artırdığını tespit etmiştir. Barabanova ve ark (1988)'da, NAA gibi bir oksin olan IAA'nın kök ve sürgün gelişimini artırdığını belirtmişlerdir. Cai ve ark. (1989), olgunlaşmamış embriyo kültüründe, kallus oluşum oranlarındaki değişimi (%71-100), çevre koşulları ile deneysel hatalara, sürgün ve kök gelişimindeki değişiklikleri ise (%0-60) genotipik farklılıklara bağlamışlardır. Bu çalışmada da benzer faktörlerin etkili olduğu söylenebilir.

5.4. Olgunlaşmış Embriyo Kültürü

Olgunlaşmış embriyoların materyal olarak kullanıldığı iki yıl tekrarlanan denemelerde, kallus oluşum oranları oldukça yüksek bulunmuştur (1.yıl %76-100, 2.yıl %25-93). Ancak, ilk yılın verileri, ikinci yıla göre daha yüksektir. Kallus oluşum oranları açısından da yapılan istatistiksel analizlerde, iki yıl arasındaki fark önemli bulunmuştur ($P < 0.05$). Aynı kültür ortamlarının kullanılmasına rağmen iki yılda ortaya çıkan farklılık; birinci ve ikinci yıl, olgunlaşmış embriyoların alındığı bitkilerin yetiştirme koşulları ile, kültür odası şartlarına (sıcaklık, nem, ışık miktarı) bağlanabilir.

Olgunlaşmış embriyo kültüründe, kallus ağırlıklarına göre, temel MS (1962) ortamına, 2,4-D ve kinetin ilavesi yapılan ortam-2'nin, diğer üç ortama göre daha uygun olduğu gözlenmiştir. Schaeffer ve ark. (1979), olgunlaşmış embriyo

kültüründe, 2-İP (sitokinin), 2,4-D, NAA ve glutamin (amino asit) ilavesi yapılmış temel MS ortamının uygun olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacıların (23,38) kallus oranları bakımından elde ettikleri sonuçlarla, çalışmamızda elde edilen sonuçlar benzerlik göstermesine karşın (her iki çalışmada da %50 ile %100 arasında kallus oluşumları tespit edilmiştir) . en fazla kallus oluşum oranı meydana getiren ortamlar farklıdır. Bu farkın, çeşitlerin genotiplerinden kaynaklanabileceği sonucuna varılabilir.

Denemede elde edilen kalus yapılarının, sıkı, boğumlu ve yeşil büyüme merkezlerine sahip oldukları tespit edilmiştir. Schaeffer ve ark. (1979), yaptıkları çalışmada, elde ettikleri kallus yapılarının da aynı özellikleri gösterdiğini belirtmişlerdir.

6. SONUÇ

1991 ve 1992 yıllarında yapılan denemelerde, kültüre alınan yaprak eksplantlarından; ortalama olarak ortam-1'de %50, ortam-2'de %2.5, ortam-3'de %31, ortam-4'de %13 oranlarında, olgunlaşmamış embriyolardan; ortam-1'de %84, ortam-2'de %94, ortam-3'de %71, ortam-4'de %58 oranlarında ve olgunlaşmış embriyolardan; ortam-1'de %95, ortam-2'de %92, ortam-3'de %62 ve ortam-4'de de %51 oranlarında kallus oluşumu gözlenmiştir. Kültüre alınan anterlerde ise herhangi bir gelişme gözlenmemiştir.

Tespit edilen kallus oluşum oranlarına göre, ortamların değerlendirilmesinde; yaprak eksplantlarında ve olgunlaşmış

embriyolarda ortam-1'in, olgunlaşmamış embriyolarda da ortam-2'nin, bu bitkisel materyaller için uygun ortamlar olduğu sonucuna varılmıştır.

√ transformasyonuna göre hesaplanan kallus ağırlıklarının, en küçük kareler ortalamalarının, çoklu karşılaştırma testinde, ortam-2'nin, ortam-1 ve ortam-4 ile arasındaki farkın önemli olduğu bulunmuştur (P<0.05). Bu istatistiksel sonuca göre, ortam-2'nin, ortam-1 ve ortam-4'e göre daha ağır kalluslar meydana getirdiği, ortam-3'de meydana gelen kallus ağırlıklarının ise farklı olmadığı saptanmıştır.

Sürgün oluşumu bakımından ise, yaprak eksplantlarından, ortam-4'de olgunlaşmamış embriyolardan, ortam-2 ve ortam-4'de, olgunlaşmış embriyolardan ise, 4 ortamda da başarılı sonuçlar alınmıştır. Tüm bitkisel materyallerden elde edilen sürgün sayıları, ortamlara göre değerlendirildiğinde, toplam 240 tüpten, 105'inde, sürgün oluşumu gözlenen ortam-4, en fazla sürgün veren ortam olmuştur.

Kültüre alınan bitkisel materyallerden, meydana gelen kökçük oluşumlarına göre, yaprak eksplantlarından, ortam-1 ve ortam-2'de, olgunlaşmamış embriyolardan, ortam-1'de ve olgunlaşmış embriyolardan, ortam-2'de en iyi sonuçlar alınmıştır. Tüm bitkisel materyallerden elde edilen, toplam kök sayılarına göre ortamların değerlendirilmesinde de, ortam-2'nin, en fazla kök oluşturan ortam olduğu tespit edilmiştir.

Tüm bu sonuçlara göre; Doğu-88 buğday çeşidinin, kallus oluşumu için uygun bir çeşit olduğu, bu çeşitten alınan,

bitkisel materyallerden, en iyi sonucu veren, olgunlaşmamış ve olgunlaşmış embriyoların, sadece 2 mg/l 2,4-D veya 2 mg/l 2,4-D ile 1 mg/l kinetin ilavesi yapılmış temel MS ortamlarında, başarılı bir şekilde kullanılabileceği belirtilebilir. Sürgün oluşumunda, temel MS ortamına ilaveten, 2 mg/l 2,4-D, 1 mg/l kinetin, 1 mg/l NAA ve 150 mg/l asparajin içeren ortam-4'ün, kök oluşumunda, 2 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l kinetin içeren ortam-2'nin uygun ortamlar olduğu ve her iki oluşum için (sürgün ve kök), olgunlaşmış embriyoların da en iyi bitkisel materyal olduğu sonucuna varılmıştır.

ÖZET

Doğu-88 Buğday çeşidinin, dört farklı kısımlarından alınan bitkisel materyaller (yaprak parçaları, anterler, olgunlaşmamış embriyolar ve olgunlaşmış embriyolar), dört farklı yapay besin ortamında, in Vitro'da kültüre alınmıştır. Test edilen kültür ortamları aşağıda verilmiştir.

- 1- MS+2,4-D(2mg/l)
- 2- MS+2,4-D(2mg/l)+Kinetin(1mg/l)
- 3- MS+2,4-D(2mg/l)+Kinetin(1mg/l)+NAA(1mg/l)
- 4- MS+2,4-D(2mg/l)+Kinetin(1mg/l)+NAA(1mg/l)+Asparajin (150mg/l)

Sterilizasyon için, tüm bitkisel materyaller, 3 kısım su, 1 kısım çamaşır suyu (%53'lük sodyum hipoklorit) ile hazırlanan sterilant solusyon içinde 15 dakika bekletilmiştir. Daha sonra %96'lık alkolde 6 dakika bekletilmiş ve 3 kez steril saf su ile çalkalanmıştır.

Anterler, olgunlaşmamış embriyolar ve olgunlaşmış embriyolar, 1500lux ısıktta, yaprak eksplantları ise karanlıkta kültüre alınmıştır. Ortalama sıcaklık 23.5°C idi.

Deneme, faktöriyel deneme desenine göre, iki tekerrürlü olarak kurulmuş ve değerlendirilmiştir. Veriler $\sqrt{}$ transformasyonuna tabi tutulmuştur. Gözlemler 42 gün devam etmiştir. Gözlemler sonunda, kallus, sürgün ve kök oluşumları gözlenen tüp sayıları belirlenmiştir. Ayrıca, kallusların ağırlıkları tartılmış ve sürgün boyları ölçülmüştür.

Gözlemler sonunda, Yaprak eksplantları, olgunlaşmamış

embriyolar ve olgunlaşmış embriyolarda başarı elde edilmiştir. Anterlerde ise başarısız olunmuştur.

Kallus oluşumu için: ortam-1 ve ortam-2'nin, sürgün oluşumu için, ortam-4'ün ve kök oluşumu için ortam-2'nin, uygun ortamlar olduğu tespit edilmiştir. Bitkisel materyallerden, olgunlaşmamış embriyolar ile olgunlaşmış embriyoların, en yüksek kallus oluşum oranlarını, yine olgunlaşmış embriyoların, en fazla sayıda sürgün ve kök oluşumunu meydana getirdikleri saptanmıştır.

Denemede, iki tip kallus ayırt edilmiştir. Yaprak eksplantlarından elde edilen kalluslar, yumuşak, gevşek yapıda, çok loblu ve seffaf renkli bulunmuştur. Olgunlaşmamış embriyolar ile olgunlaşmış embriyolardan elde edilen kallusların ise, daha sıkı yapıda, sert, az boğumlu ve mat renkli oldukları gözlenmiştir.

~~SUMMARY~~

Plant materials taken from four different sections of the Doğu 88 varieties of *T. aestivum* (leaf segments, anthers, immature embryos and mature embryos) was cultured in four different artificial sustenance medium in *in vitro*. The tested medium as follow;

- 1- MS+2,4-D(2mg/l) (med.1)
- 2- MS+2,4-D(2mg/l)+Kinetin(1mg/l) (med.2)
- 3- MS+2,4-D(2mg/l)+Kinetin(1mg/l)+NAA(1mg/l) (med.3)
- 4- MS+2,4-D(2mg/l)+Kinetin(1mg/l)+NAA(1mg/l)+Asparajin (150mg/l) (med.4)

Whole plant material, for sterilization has been waited for 15 minutes in a solution include 3 part of distilled water and 1 part of sodium hypochloride (53%). After then materials was waited in 96% alcohol for 6 minutes and washed tree times with sterile distilled water.

Anthers, immature embryos and mature embryos kept under continuous light 1500 lux, however leaf segments was cultured in the dark. The temprature on an average was at 23.5 C.

Experiment was planned and analysed as factorial design with two repetation. Data has been converted with rootsquare transformation for get normality. Observations was continued during 42 days. Callus, shoot and root formation determined in tubes after observation. In addition weight of callus was weighted and lenght of shoot was measured. A succesful conclution had gotton on leaf segments, immature embryos and mature embryos. This study was failed

on anthers. The appropriate medium was found for callus formation on medium-1 and medium-2, for shoot formation on medium-4 and for root formation on medium-2. Immature embryos and mature embryos was shown the highest the percentage of calluses formation, so mature embryos was produced the highest numbers of shoot and root formation.

Two types calluses was distinguished in this study. The calluses from leaf segments has been obtained was soft, in slack structures, too nodular and diaphanous colors. The calluses from immature and mature embryos has been obtained was more strict, hard, less nodular and dull colors.

LİTERATUR

- 1- Gönülşen,N., 1987: Bitki Doku Kültürleri. Tarım Orman ve Köy İşleri Bakanlığı, Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Yayınları. Yay.No:78, Menemen, İzmir.
- 2- Kınacı.G., Kınacı.E., 1992: Arpada Doku Kültürü. 2. Arpa-Malt Semineri. 25-27 Mayıs, Konya.
- 3- Bürün,B., 1988: Androjenetik Tütün Haploidlerinden Dihaploidlerin Elde Edilmesinde, Asenaftenden Yararlanma. Doktora tezi. Bornova, İzmir.
- 4- Emiroğlu.Ü., 1982: Haploidi ve Bitki İslahındaki Önemi. Ege Univ. Zir. Fak. Yayınları. Yay.No:450, Bornova, İzmir.
- 5- Günel.E., Bürün.B., 1991: Androjenetik Tütün Haploidlerinin Elde Edilmesinde, Soğuk Uygulamasının Etkisi. Y.Y. Univ., Zir. Fak. Dergisi. Cilt:1, No:1, Say.165-182.
- 6- Bürün,B., Emiroğlu.Ü., 1985: Besin Ortamındaki Farklı Şeker Konsantrasyonlarının Tütünde Androjenetik Haploidlerin Gelişimine Etkisi. E.Ü.Z.F. Dergisi. Vol.22, No:2, Say.29-42, Bornova, İzmir.
- 7- Sağsöz.S., 1992: Sitogenetik. Atatürk Univ. Yayınları, No:703, Zir. Fak. No:307, Ders Kitapları Serisi No:59, Erzurum.
- 8- Bürün,B., 1991: Basılmamış Ders Notları. Van.
- 9- Wenzel,G., Foroghı-Wehr,B., Friedt, W., Köhler, F., 1984:

- Anther Culture in Crop Plants. Biotechnology in International Agricultural Research. Proceedings of the Inter-Center Seminar on International Agricultural Research Centers and Biotechnology. 23-27 April, 1984.
- 10- Ahloowalia, B.S.. 1982: Plant Regeneration from Callus Culture in Wheat. Crop Science, Vol.22, 405-410.
- 11- Hanzel, J.J., Miller, J.P., Brinkman, M.A., Fendos, E., 1985: Genotypic and Media Effects on Callus Formation and Regeneration in Barley. Crop Science, Vol. 25.
- 12- De Buyser, J., Henry, Y., Amsua, M., 1981: In Vitro Anther Culture of Wheat (*Triticum aestivum* L.): Chromosome Variations. International Symposium of the Section Mutation and Polyploidi of the European Association for Research on Breeding Eucarpia, August 31- September 4, Wageningen, Netherlands.
- 13- Tuberosa, R., Ravaglia, S., Lucchese, C., 1988: Callus Induction and Plant Regeneration in Italian Cultivars of Bread Wheat. Agricoltura Mediterranea 118, 361-365.
- 14- Liang, H.G., Xu, A., Tang, H., 1987: Direct Generation of Wheat Haploids via Anther Culture. Crop Science, Vol.27, March-April.
- 15- Datta, S.K., Potiykus, I., 1989: Artificial Seeds in Barley: Encapsulation of Microspore-Derived Embryos. Theor Appl. Genet., 77:820-824.

- 16- Zhou,H., Zheng,Y., Konzak.C.F., 1991: Osmotic Potential of Media Affecting Green Plant Percentage in Wheat Anther Culture. Plant Cell Reports, 10:63-66.
- 17- Shimada,T., Otani,M., 1989: Varietal Differences in Green Plant Regeneration Ability of Wheat Pollen Embryoids. English Summary on, P.194.
- 18- Greco.B., Tanzarella, G.A., Bianco,A., 1984: Plant Regeneration from Leaf Base Callus in Durum Wheat (*Triticum durum desf*). Cereal Research Communications, Vol.12, No:3-4.
- 19- Prilyuk.L.V., 1988: Organogenesis in Callus Culture of four Wheat Species. Nauchno- Tekhnicheskii. Byulleten Vsesoyuznogo Ordena Lenina i Ordena Druzhby Narodov Nauchno- Issledovatel'skogo Instituta Rasteniyevodstva Imeni N.I. Vavilova, No:177, P.58-62, Leningrad, USSR. (P.B.A. 1990, Vol.60, No:1, Abs. No:172).
- 20- Prilyuk,L.V., 1988: Plant Regeneration in Callus Culture of four Wheat Species. In Biologiya Kul'tiviru emkhy Kletok i Biotekhnologiya. i Novosibirsk, 113. USSR. (P.B.A. 1990, Vol.60, No:3, Abs. No:2207).
- 21- Grossman,K., Saverbrey,E., Jung,J., 1989: Influence of Growth Reterdants and Ethylene-Generating Compound on Culture Response of Leaf Explants From Wheat (*Triticum aestivum L.*). J. Plant Phisiol, Vol.135, P.725-731, 1990.
- 22- Tabaeizade,H.Z., Plourdea.A., Comeav,A., 1990: Somatic

- Embryogenesis and Plant Regeneration in *Triticum aestivum* x *Leymus angustus* F1 Hybrids and the Parental Lines. *Plant Cell Reports*, 9(4), 204-206, (En. 16Ref.).
- 23- Schaffer, G.W., Baenziger, P.S., Warley, J., 1979: Haploid Plant Development from Anthers and *In Vitro* Embryo Culture of Wheat. *Crop Science*, Vol.19.
- 24- Gideon, W., Schaeffer, G.W., Baenziger, P.S., 1982: Anther Culture and Pollen Plant Regeneration in Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Tissue Culture*.
- 25- Lazar, M.D., Baenziger, P.S., Schaeffer, G.W., 1983: Combining Abilities and Heritability of Callus Formation and Plantlet Regeneration in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Anther Cultures. *Theor Appl. Genet.*, 1984, 68:131-134.
- 26- Lazar, M.D., Schaeffer, G.W., Baenziger, P.S., 1985: The Physical Environment in Relation to High Frequency Callus and Plantlet Development in Anther Cultures of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Cultivar Chris. *Plant Physiol.* 121(2):103-110, 1986. (Biol. Abstr. 1986, Vol.81, No:8, Abs.No:68683).
- 27- Zhag, W.X., Xu, H.J., Xin, Z.Y., Han, B., 1988: Preliminary Study on the Application of Anther Culture in the Improvement of a Spring Wheat Population. *Acta Agronomica Sinica*, 14(3), 255-259.
- 28- Hu, H., Tao, Y.Z., Wang, G., 1988: Creating New Types of Wheat via Anther Culture. In *Proceedings Of The*

- Seventh International Wheat Genetics Symposium,
Heid At Cambridge, UK., 13-19 July. (P.B.A., Vol.
60, No:2, February, 1990. Abs.No:1241).
- 29- Zhuang,J.J., Chen,G.Q., Jia,X., 1990: Study on the
Conditions for Inducing Pollen Plants from Hybrids
of 3 Genera *Triticum*, *Agropyron* and *Secale*. *Acta
Genetica Sinica*, 17(1), 17-22. (P.B.A., Vol.60,
No:12, 1990, Abs.No:11818).
- 30- Sears,R.G., Deckard,E.L., 1981: Tissue Culture Variabi
lity in Wheat: Callus induction and Plant Regenera
tion. *Crop Science*, Vol.22, May-June, 1982, 546-550.
- 31- Papenfus,J.M., Carman,J.G., 1987: Enhanced Regeneration
from Wheat Callus Cultures using Dicamba and Kine
tin. *Crop Science*, Vol.27, May-June, 588-593.
- 32- Barabanova,E.A., Bannikova,V.F., Girko,V.S., 1990: Plant
Regeneration from Cultured Embryos of Winter Wheat.
In *Biologiya Kul'tiviruemkh Kletok i Biotekhnologi
ya*,1. Novosibirsk, USSR, 110(Ru) Institut Botaniki,
An USSR, Kiev, Ukrainian SSR. (P.B.A., Vol.60, No:3,
1990, Abs.No:2210).
- 33- Batyrgozhin,B.A., 1988: Morphogenesis in Cell Suspension
Culture of Wheat. In *Biologiya Kul'tiviruemkh Kletok
i Biotekhnologiya*,1. Novosibirsk USSR, 152-153 (Ru).
(P.B.A., Vol.60, No:2, 1990, Abs.No: 1247).
- 34- Liang,Z.Q., Gao,M.W., Cheng,X.Y., 1988: Study on invitro
Technique for Immature Embryo Culture of Wheat
Breeding. *Acta Agronomica Sinica*, 14(2), 137-142,

- (Ch.En,3Ref). China. (P.B.A., Vol.60, No:1, 1990, Abs.No:174).
- 35- Cai,T.S., Tian,H.Q., Lin,S.K., Li,J.M., 1989: Effect Of Genotype and Embryo age on the Response of *In Vitro* Cultured Immature Embryos of Wheat. *Acta Genetica Sinica*. 14(2). 137-142. (Ch.En,16Ref), Beijing, China. (P.B.A., Vol.60, No:1, 1990, Abs.No:174).
- 36- Darlington,C.D., La Cour,L.F., 1962: *The Handling of Chromosomes*. George Allen Unwin Ltd.. London.
- 37- Dodds,J.H., Roberts,L.W., 1985: *Experiments Plant Tissue Culture*. Cambridge University Press, 167.
- 38- Butenko,R.G., Dzhardemaliev,Zh.K., Gavrilova,N.F., 1986: Callus Formation Ability in Explants of Different Organs of Winter Wheat Cultivars. *Fiziologiya Ras tenii*, 33:2, 350-355, 15Ref. (Field Crop Abstracts, No:039, 1986. Abs.No:08257).