

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

**TUZLU (NaCl) KOŞULLARDA KALSİYUM VE PROLİNİN
MAKARNALIK BUĞDAY (*Triticum durum* Desf.) GENOTİPLERİNDE
HAPLOİD BİTKİ ÜRETİMİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Rağbet Ezgi DURAN

Danışman: Prof. Dr. Çiğdem SAVAŞKAN

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
ISPARTA-2011**

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Tuz Stresinde Kalsiyumun Önemi	2
1.2. Tuz Stresinde Prolinin Önemi.....	4
2. KAYNAK ÖZETLERİ	12
2.1. Anter Kültürü ve NaCl ile İlgili Çalışmalar.....	12
2.2. Prolin ve Kalsiyum ile İlgili Yapılan Çalışmalar.....	25
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	29
3.1. Materyal	29
3.2. Yöntem.....	30
3.2.1. Donör (verici) bitkilerin yetiştirilmesi ve başakların toplanması	30
3.2.2. Soğuk ön işlem.....	31
3.2.3. Kültür ortamlarının hazırlanışı.....	32
3.2.4. Steril ortamda yapılan işlemler	36
3.2.5. Regenerasyon işlemi	39
3.2.6. Verilerin değerlendirilmesi.....	39
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	41
4.1. Genotip Etkisi	41
4.2. Soğuk Ön işlemin Buğday Genotipleri Üzerindeki Etkisi.....	46
4.3. Buğday Genotiplerinin NaCl+Kalsiyum Uygulamasına Cevabı	49
4.3.1. NaCl+Ca kombinasyonunun buğday genotiplerinin regenerasyon yeteneğine etkisi.....	51
4.4. Buğday Genotiplerinin NaCl+Prolin Uygulamasına Cevabı	56

4.4.1. NaCl + Prolin kombinasyonunun buğday genotiplerinin regenerasyon yeteneğine etkisi	58
4.5. Buğday Genotiplerine Uygulanan NaCl konsantrasyonlarına Ajanların (Kalsiyum ve Prolin) Etkilerinin Toplu Sonuçları	63
4.5.1. NaCl ve NaCl+ajanların (kalsiyum ve prolin) buğday genotiplerinin regenerasyon yeteneğine etkisinin toplu sonuçları.....	65
4.5.1.1. “Kızıltan 91” çeşidine ait toplu sonuçlar.....	65
4.5.1.2. “Kunduru 1149” çeşidine ait toplu sonuçlar.....	66
4.5.1.3. “Mirzabey 2000” çeşidine ait toplu sonuçlar.....	70
4.5.1.4. “Ç 1252” çeşidine ait toplu sonuçlar.....	74
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	75
6. KAYNAKLAR	94
EKLER.....	116
ÖZGEÇMİŞ.....	122

ÖZET

Doktora Tezi

TUZLU (NaCl) KOŞULLARDA KALSİYUM VE PROLİNİN MAKARNALIK BUĞDAY (*Triticum durum* Desf.) GENOTİPLERİNDE HAPLOİD BİTKİ ÜRETİMİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Rağbet Ezgi DURAN

Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Çiğdem SAVAŞKAN

Bu çalışmada 4 makarnalık buğday çeşidinin (*Triticum durum* Desf. cvs. ‘Kundur 1149’, ‘Kızıltan 91’, ‘Mirzabey 2000’, ‘Ç 1252’) anter kültürüne cevabı ve kallus üretim kapasiteleri araştırılmıştır. Donör buğday bitkileri 16 saat/gündüz 8 saat/gece fotoperiyod düzeninde, 12 kilolüks ışık yoğunluğu, 18-20 °C sıcaklık ve %51-54 nem oranı koşulları altında bitki büyüme kabini içinde yetiştirilmiş ve +4°C sıcaklıkta 0 ve 7 gün soğuk ön işlem uygulamasına maruz bırakılmışlardır. Denemede, orta veya geç tek çekirdekli mikrosporları bulunduran anterler asetokarmin metodu ile belirlenmiş ve kallus oluşumu için fikel ile hazırlanan 190-2 ve C17 başlangıç kültür ortamlarına alınmıştır. Kültürlerin inkübasyonu bu ortamlarda 28°C’de ışıksız ortamda yapılmıştır. Yaklaşık 2 mm büyüklüğe ulaşan kalluslar daha sonra çeşitli NaCl (0, 0.5, 1 ve 1.5 mM) konsantrasyonları ve bu NaCl konsantrasyonlarına ek olarak prolin (2 mg/l) ve Ca⁺² (1 mM CaCO₃) içeren rejenerasyon ortamlarına alınmıştır. Kalluslar 25 °C sıcaklık ve 16/8 gündüz/gece fotoperiyodu düzeninde regenerant üretimi için bekletilmiştir. Daha sonra genotiplerin bu ortamlarda rejenerasyon kapasiteleri belirlenmiştir.

Kundur 1149 çeşidi toplamda % 22.50 kallus oluşumu ile anter kültürüne en yüksek cevabı veren çeşit olurken (P<0.01) en iyi rejenerasyon ve yeşil rejenerant oranı Kızıltan 91 çeşidinde meydana gelmiştir (P<0.05). Bununla beraber 7 günlük soğuk ön işlem uygulaması tüm çeşitlerde kallus üretimini önemli derecede arttırmıştır (P<0.01). Rejenerasyon ortamına eklenen NaCl tüm genotiplerin rejenerasyon yeteneğini kademeli olarak azaltmıştır. Bununla beraber NaCl’nin Ca⁺² veya prolin ile beraber bulunduğu ortamlarda toplam rejenerasyon ve yeşil rejenerant miktarı çeşitli oranlarda artışlar göstermiştir. Bu artışlar, Ca⁺² ilave edildiğinde (P<0.01) ve prolin ilavesinde önemli sonuçlar vermiştir (P<0.05).

Anahtar Kelimeler: Anter kültürü, *Triticum durum* Desf., tuzluluk, kalsiyum, prolin.

2011, 123 sayfa

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

THE EFFECTS OF CALCIUM AND PROLINE UNDER SALT (NaCl) CONDITIONS ON HAPLOID PLANT PRODUCTION IN DURUM WHEAT (*Triticum durum* Desf.) GENOTYPES

Rağbet Ezgi DURAN

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

Supervisor: Prof. Dr. Çiğdem SAVAŞKAN

Anther culture response and callus production capacity of four durum wheat genotypes (*Triticum durum* Desf. cvs. ‘Kundurur 1149’, ‘Kızıltan 91’, ‘Mirzabey 2000’, ‘Ç 1252’) have been investigated in this study. Donor plants were grown in the plant growth chamber at 18-20°C with a 16/8-hour (day/night) photoperiod, 12 klux light intensity, 51-54% humidity and spikes were cold pretreated (4°C) for 0 and 7 days. Microspore stages were cytologically determined after squashing anthers in acetocarmine. Anthers containing microspores at the mid to late uninucleate stage were used for culture and aseptically inoculated in the 190-2 and C17 induction medium for callus production. Cultures were incubated at 28°C in the dark. When the size of the calli reached about 2 mm, they were transferred to the regeneration medium with various NaCl concentrations (0, 0.5, 1 ve 1.5 mM), NaCl+proline (2mg/l) and NaCl+Ca⁺² (1 mM CaCO₃). Calli were incubated at 25°C temperature and 16/8 light/dark condition for regeneration and regeneration capacity of genotypes. After that, regeneration capacity of genotypes were determined on this media.

Kundurur 1149 cultivars showed the highest anther responses with 22.50% among the other genotypes (P<0.01). Whereas Kızıltan-91 showed the highest regeneration and green regenerant capacity of four genotypes (P<0.05). Also, 7-days cold pretreatment enhanced the callus production in all genotypes significantly (P<0.01). NaCl decreased the regeneration capacity of all genotypes gradually. However, amount of total regeneration and green regenerants increased by various percentages in which NaCl presented with Ca⁺² or proline medium. These increases were found significant in Ca⁺² (P<0.01) and proline (P<0.05) applications.

Key Words: Anther culture, *Triticum durum* Desf., salinity, calcium, proline.

2011, 123 pages

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim boyunca desteğini esirgemeyen, beni biyoteknoloji ile tanıştıran, öneri ve yorumlarıyla yetişmemde büyük katkıları olan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Çiğdem SAVAŞKAN'a; çalışmamda önerileriyle bana yol gösteren ve her konuda yardımlarını gördüğüm hocalarım Prof. Dr. Betül BÜRÜN ve Prof. Dr. Hasan ÖZÇELİK'e teşekkürlerimi sunarım.

Bana dostluk, arkadaşlık, kardeşlik eden ve başım her sıkıştığında yardımına koşan çalışma arkadaşım Biyoloji Bölümü Araştırma görevlisi Dr. Yasemin COŞKUN'a teşekkür ederim.

Tez çalışmamın tamamlanmasında büyük katkısı olan TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na (BİDEB) ve SDUBAP 1868-D-09 No'lu proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetimi Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Sonsuz sevgisi ve güveniyle beni bu günlere getiren ve hep yanımda olduğunu bildiğim sevgili annem Emine DURAN, babam Vahap DURAN ve ağabeyim Evren DURAN'a...

RAĞBET EZGİ DURAN
ISPARTA, 2011

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Anter kültürü ile haploid bitki üretim aşamaları ve dihaploid bitkilerin üretilmesi.....	9
Şekil 3.1. Makarnalık buğday çeşitlerine ait tohumlar	29
Şekil 3.2. Donör bitkilerin yetiştirilmesi ve toplanması	31
Şekil 3.3. Soğuk önişleme alınmak üzere kılçıkları kesilmiş ve 9 cm’lik petri kaplarına konulmuş başaklar	32
Şekil 3.4. Kültür ortamlarının hazırlanması.....	33
Şekil 3.5. Kültür ortamlarının hazırlanması.....	34
Şekil 3.6. Gelişen anterde hücrel bağları gösteren diyagramlar	36
Şekil 3.7. Steril ortamda yapılan işlemler	37
Şekil 3.8. Kültürlerin inkübasyonu ve kallus oluşumu	38
Şekil 3.9. Regenerasyon işlemi	39
Şekil 4.1. Buğday genotiplerinin anter kültürüne cevabı.....	44
Şekil 4.2. Buğday genotiplerinden elde edilen kalluslar.....	45
Şekil 4.3. Buğday genotiplerinin NaCl+Kalsiyum uygulamasına cevabı.....	49
Şekil 4.4. NaCl+Kalsiyum içeren ortamlarda bulunan kallus ve oluşan regenerantlar.....	53
Şekil 4.5. NaCl+Kalsiyum kombinasyonunun buğday genotiplerinin regenerasyon yeteneğine etkisi.....	54
Şekil 4.6. Buğday genotiplerinin NaCl+Prolin uygulamasına cevabı	56
Şekil 4.7. NaCl+prolin ile modifiye edilmiş MMS3 ortamında meydana gelen regenerantlar.....	60
Şekil 4.8. NaCl+Prolin kombinasyonunun buğday genotiplerinin regenerasyon yeteneğine etkisi.....	61
Şekil 4.9. Buğday genotiplerine uygulanan NaCl konsantrasyonlarına ajanların (Kalsiyum ve Prolin) etkilerinin toplu sonuçları	63
Şekil 4.10. NaCl ve NaCl+Ajanların (Kalsiyum ve Prolin) “Kızıltan 91” çeşidi regenerasyon yeteneğine etkisi.....	66
Şekil 4.11. NaCl ve NaCl+Ajanların (Kalsiyum ve Prolin) “Kundur 1149” çeşidi regenerasyon yeteneğine etkisi	67

Şekil 4.12. NaCl ve NaCl+Ajanların (Kalsiyum ve Prolin) “Mirzabey 2000” çeşidi regenerasyon yeteneğine etkisi.	71
Şekil 4.13. NaCl ve NaCl+Ajanların (Kalsiyum ve Prolin) “Ç 1252” çeşidi regenerasyon yeteneğine etkisi	72

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. 190-2 ve C17 başlangıç ile MMS3 regenerasyon ortamı bileşenleri.....	35
Çizelge 4.1. Deneme verilerinin varyans analiz değerleri	43
Çizelge 4.2. Buğday genotiplerinin anter kültürüne cevabı.....	47
Çizelge 4.3. 0 (kontrol) ve 7 gün soğuk ön işlem uygulamasının genotiplerin anter kültürüne cevabı	48
Çizelge 4.4. Buğday genotiplerinin NaCl+Kalsiyum uygulamasına cevabı.....	50
Çizelge 4.5. NaCl+Kalsiyum kombinasyonun buğday genotiplerinin regenerasyon yeteneğine etkisi.....	55
Çizelge 4.6. Buğday genotiplerinin NaCl+Prolin uygulamasına cevabı.....	57
Çizelge 4.7. NaCl+Prolin kombinasyonun buğday genotiplerinin regenerasyon yeteneğine etkisi.....	62
Çizelge 4.8. Buğday genotiplerine uygulanan NaCl konsantrasyonlarına ajanların (Kalsiyum ve Prolin) etkilerinin toplu sonuçları.....	64
Çizelge 4.9. NaCl ve NaCl+Ajanların (Kalsiyum ve Prolin) Kızıltan 91 çeşidi regenerasyon yeteneğine etkisinin toplu sonuçları	68
Çizelge 4.10. NaCl ve NaCl+Ajanların (Kalsiyum ve Prolin) Kunduru 1149 çeşidi regenerasyon yeteneğine etkisinin toplu sonuçları	69
Çizelge 4.11. NaCl ve NaCl+Ajanların (Kalsiyum ve Prolin) Mirzabey 2000 çeşidi regenerasyon yeteneğine etkisinin toplu sonuçları	73
Çizelge 4.12. NaCl ve Ajanların (Kalsiyum ve Prolin) Ç 1252 çeşidi regenerasyon yeteneğine etkisinin toplu sonuçları.....	74

SİMGELER DİZİNİ

DH	Doubled haploid
190-2	Wang ve Hu (1984) tarafından geliştirilen kültür ortamı
C-17	Wang ve Chen (1986) tarafından geliştirilen kültür ortamı
MMS3	Hu ve Kasha (1997) tarafından geliştirilen kültür ortamı
NaOH	Sodyum hidroksit
HCl	Hidroklorik asit
NaCl	Sodyum klorür
CaCO ₃	Kalsiyum karbonat
mM	Milimolar
MPa	Megapaskal
NAA	Naftelen asetik asit
IAA	İndol asetik asit
2,4-D	2,4 dikloro fenoksi asetik asit
$\Psi\pi$	Osmotik basınç

1. GİRİŞ

Tarım yapılan alanlarda verimliliği olumsuz yönde etkileyen etmenlerden birisi de tuzluluktur. Kurak ve yarı kurak bölgeler yeryüzünün yaklaşık % 46'sını kaplar. Bu iklim bölgelerinde sulanan alanların yaklaşık % 50' sinde ise değişik düzeylerde tuzluluk sorunu vardır. FAO/UNESCO tarafından hazırlanan raporlarda, Dünya Toprak Haritası verilerine dayanarak, dünya genelinde 954 milyon hektar tuzdan etkilenmiş ve üretkenliği kısıtlanmış toprak yüzeyi bulunduğu bildirilmektedir. Bu tip sorunlu topraklar, Afrika' da 80.5 milyon, Avrupa' da 50.8 milyon, Avustralya'da 357.3 milyon, Amerika'da 146.9 milyon ve Asya kıtasında 319.3 milyon hektar alan kaplamaktadır. Ülkemizde tuzlu, sodyumlu ve borlu topraklar İç Anadolu başta olmak üzere 1.6 milyon hektar alan kaplarlar. Özellikle batı ve güney bölgelerimizde aşırı sulamalar sonucu toprak kalitesi bozulmuş, tuzlanma, zararlı ve hastalık oranları artmış ve verim düşmeye başlamıştır. Çukurova, Gediz, Söke ve Amik Ovaları tipik örneklerdir. Daha fazla yiyecek talep eden ve sürekli artan bir nüfus ile verimli arazilerin bozulmasının aynı zamanda ortaya çıkması, çorak toprakların oluşumunda insan faktörünün etkisini göstermektedir. Yapılan bir tahmine göre önümüzdeki 75 yıl içinde tarım arazilerinin yaklaşık % 10 artabileceği, buna karşın dünya nüfusunun iki katına çıkacağı ve bu nüfus artışının büyük bir kısmının tuzluluğun çok yaygın olduğu dünyanın yarı kurak ve kurak bölgelerinde beklenmesi, konunun önemini göstermektedir (Sönmez, 2003).

Topraklarda bulunan tuzlar genellikle; klorürler (NaCl , KCl , MgCl_2 , CaCl_2), sülfatlar (Na_2SO_4 , MgSO_4 , K_2SO_4 , CaSO_4), nitratlar (Na_2NO_3 , KNO_3), karbonatlar, bikarbonatlar (CaCO_3 , MgCO_3 , Na_2CO_3 , K_2CO_3 , NaHCO_3) ve boratlardır (Köşkeröğlu, 2006). Ancak doğada en fazla rastlanan tuz formu NaCl 'dir (Tal, 1983). Bu tuzlar bitkilerin büyümelerini çeşitli şekillerde etkilemektedir. Tuzların çeşitleri, karışımları ve özelliklerine göre bitkiler üzerindeki etkileri farklı olabilmektedir. Farklı büyüme devrelerinde olan bitkiler, belli bir tuzun aynı miktardaki yoğunluğunda dahi farklı şekillerde etkilenmektedirler. Bitki büyümesinin genel olarak çözünebilir tuzlar tarafından etkilenmesi temel iki nedenden kaynaklanmaktadır. Bunlar; (i) Osmotik etki: Saf suyun elektrik akımını

iletme gücü çok zayıftır; Bir suyun iletkenliği içerdği çözünmüş iyonlara bağlıdır. Suda tuz konsantrasyonunun artışı, elektriksel iletkenliği arttırarak osmotik potansiyeli düşürür (osmotik basıncı arttırır). Köklenme bölgesindeki çözünmüş maddeler, düşük (daha negatif) bir osmotik potansiyele sahiptirler. Bu düşük osmotik potansiyel toprağın su potansiyelini de düşürür. Dolayısıyla bitkilerin su alımında zorlaşır (Taiz and Zeiger, 2008) (ii) İyonik etki: Toprak çözeltisindeki bazı iyonların ve tuzların bitkiler için toksik olmaları nedeniyle bitkilerin metabolik ve beslenme fonksiyonlarının bozulmasıdır (Lichtenhaler, 1996). Na^+/K^+ oranının anormal ölçüde yüksek olması enzimleri etkisizleştirir ve protein sentezini engeller (Taiz and Zeiger, 2008). Tuzluluk, ekonomik önemi olan tahıllar dahil, tüm bitkilerin normal fizyolojik ve biyokimyasal işlevlerinde değişikliklere yol açmaktadır. Bu stres bitkilerin biyosentetik kapasitelerini azaltır, normal fonksiyonlarını değiştirir ve bitkinin ölümüne yol açabilecek zararlara neden olabilir.

Bitkilerinin tümü tuzluluğa karşı aynı tepkiyi göstermezler. Bazı bitkiler tuzluluğa karşı daha hassas iken bazı bitkiler daha dayanıklıdır. Bitkilerin tuza karşı metabolizmalarını koruyabilme derecesi tuza dayanıklılık olarak ifade edilmektedir. Tuza dayanıklılık, bir bitkinin ya protoplazmada ulaşılan aşırı tuz miktarının düzenlenmesi ya da alternatif olarak, artan iyon konsantrasyonu ile bir araya gelen toksik ve osmotik etkilere tolerans gösterme yeteneği ile sağlanabilmektedir (Levitt, 1980).

1.1. Tuz Stresinde Kalsiyumun Önemi

Toprak çözeltisinde bazı iyonların yüksek yoğunluklarda bulunması, bitkilerin gelişmesi için gerekli bitki besin maddelerinin yeter miktarda alınmasına engel olur (Crawley, 1997). Örneğin fazla kalsiyum, bazı bitkilerde potasyum alımını güçleştirir, buna karşılık yüksek miktardaki magnezyum veya sodyum ise potasyum yetersizliği yaratır. Bazı iyonların az veya çok miktarlarda bitki bünyesine yığılmaları, onlara zarar vermeleri, bitkinin çeşidine bağlı olarak değişmektedir. Örneğin topraktaki yüksek Na^+ konsantrasyonları, Ca^{+2} alım ve iletimini azaltmakta ve sonuç olarak düşük Ca^{+2} konsantrasyonuna ya da yüksek Na^+/Ca^{+2} oranına sahip

ortamlarda yetişen bitkilerde Ca^{+2} eksikliği meydana gelmektedir (Lynch and Lauchli, 1985). Yani yüksek tuz konsantrasyonları bitkinin beslenme durumunu oluşturan temel elementlerden Ca^{+2} 'nin alımı ve taşınımını sınırlayarak Ca^{+2} eksikliğine ve bitkide iyon dengesizliğine yol açmaktadır. Tracy vd. (2008)'e göre; milimolar konsantrasyonlarda (apoplastta bulunan tipik Ca^{+2} konsantrasyonu) dışarıdan verilen Ca^{+2} , K^{+} taşıyıcılarının seçiciliğini arttırmakta ve Na^{+} 'nin apoplasta akışını ve alımını azaltan mekanizmalar aracılığıyla Na^{+} alımını en az seviyeye indirmektedir. Na^{+} hücrelere seçici olmayan, gerilime duyarsız kanallarla pasif taşıma yoluyla girmektedir. Bu kanallar açıldığında Na^{+} büyük ölçüde konsantre olabildiği sitozole difüze olmaktadır. Ca^{+2} 'nin fizyolojik seviyeleri bu kanalların kapanmasına ve Na^{+} alımının kısıtlanmasına neden olmaktadır (Taiz and Zeiger, 2010). Kalsiyumun tuz stresindeki olumlu etkisi, membran bütünlüğünü arttırması ve iyon alımı ve iletiminde seçiciliğin kontrolünü sağlaması nedeniyle olmaktadır (Lauchli, 1990).

Shi vd. (2000) Na^{+} 'nin plazma zarı aracılığıyla, bitki hücrelerinin sitozolünden enerji harcanarak atılmasına, SOS1 (tuza aşırı duyarlı) geninin gen ürününün aracılık ettiğini belirtmişlerdir. Bu gen ürünü, $\text{Na}^{+}\text{-H}^{+}$ taşıyıcısı olarak iş görür. SOS1 taşıyıcısı, SOS2 ve SOS3 olarak ifade edilen diğer iki gen ürünü tarafından düzenlenir. SOS2, SOS3'ün iş görmesiyle kalsiyum tarafından aktifleştirilen bir serin/threonin kinazdır. SOS3 kalsiyumca düzenlenen bir protein fosfatazdır (Taiz and Zeiger, 2008).

İki farklı buğday (*Triticum aestivum* L.) genotipi kullanılarak $\text{Na}^{+}\text{-Ca}^{+2}$ etkileşimlerinin incelendiği bir çalışmada, tuza duyarlı olan buğday genotipinde Ca^{+2} hareketinin Na^{+} tarafından inhibe edilmesinin dayanıklı çeşide göre daha fazla olduğu saptanmıştır (Davenport et al., 1997). Yüksek NaCl konsantrasyonlarında Ca^{+2} miktarının arttırılması ile Na^{+} 'nin hücre duvarı ve plazma membranına bağlantısı, hücre bölünmesi ve uzamasındaki olumsuz etkisi azalmakta, büyüme artmakta ve Na^{+} 'nin Ca^{+2} eksikliğine yol açması engellenmektedir (Navarro et al., 2000; Reid and Smith; 2000). Ayrıca Ca^{+2} , tuz stresi altında K^{+} alım ve taşınımını arttırma yoluyla da Na^{+} birikimini azaltmaktadır.

1.2. Tuz Stresinde Prolinin Önemi

Bitkilerin strese en genel cevaplarından biri farklı tipte çözünebilir organik maddelerin üretimidir (Serraj and Sinclair, 2002). Çözünebilir maddeler düşük moleküler ağırlıkta, genellikle yüksek hücresel konsantrasyonlarda toksik olmayan bileşenlerdir. Genellikle, bitkileri stresten hücresel osmotik ayarlama, reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonu, membran bütünlüğünün korunması ve enzim/protein dengesini içine alan farklı yönlerde korumaktadırlar (Yancey et al., 1982; Bohnert and Jensen, 1996). Ayrıca, bu maddelerin bazıları hücresel bileşenleri dehidrasyon zararlarından koruduğu için genellikle “osmokeruyucular” olarak adlandırılırlar. Bu maddeler, prolin, sükroz, polioller, trehaloz ve glisin betain, alanin betain, prolin betain, kolin *O*-sülfat, hidroksiprolinbetain ve pipekolatebetain gibi kuaterner amonyum bileşenlerini içermektedirler (Rhodes and Hanson, 1993). Genetik mühendisliği çalışmalarında bitkilerde çeşitli osmokeruyucuların aşırı üretimi için büyük çaba sarf edilse de, bitkilerde bu osmolitlerin miktarının istenen koruyucu seviyeye ulaştırılması mümkün olmamıştır. Alternatif olarak, bazı bitkilerin abiyotik strese dirençleri çeşitli organik maddelerin dışarıdan uygulamalarıyla sağlanmaktadır (Ashraf and Foolad, 2007).

Bu osmokeruyuculardan biri olan prolin genellikle yüksek bitkilerde meydana gelmekte ve normalde çevresel streslere cevap olarak büyük miktarlarda birirmektedir (Öztürk ve Demir, 2002; Hsu et al., 2003; Kavi Kishore et al., 2005). Bu rolüne ek olarak stres koşulları altında osmotik ayarlama için bir osmolit olarak, membran ve proteinlerin stabilizasyonuna yardımcı olarak, radikallerin temizlenmesinde ve hücresel redoks potansiyelini korumada görev yapmaktadır. Bitkide prolinin hızlı yıkımı ile, stresi hafifletmede mitokondriyal oksidatif fosforilasyonu destekleyen, stresin sebep olduğu yıkımları onaran ve stresi iyileştirmek için ATP üreten yeter miktarda indirgeyici ajan meydana gelebilmektedir (Hare and Cress, 1997; Hare et al., 1998). Bitkilerde kuraklık veya tuz stresine cevapta, prolin birikimi genelde sitoplazmik osmotik ayarına katkıda bulunduğu sitozolde meydana gelir (Ketchum et al., 1991). Bitkilerde, prolin biyosentezinin öncüsü 1-glutamik asittir. Prolin-5-karboksilat sentetaz (P5CS) ve

pirolin-5-karboksilat redüktaz (P5CR) enzimlerinin prolin biyosentetik yolunda önemli rolleri vardır (Delauney and Verma, 1993).

Stres koşulları altında büyütülen bitkilerin stres toleranslarını arttırmak için prolinin bitkilere stresten önce, sonra veya stres esnasında dışarıdan uygulaması ile bu bileşiklerin içsel miktarlarının arttığı gözlenmiş ve stres koşulları altında genellikle tahıl verimini ve bitki büyümesini arttırdığı görülmüştür. Bununla beraber farklı bitki türlerinin prolininin dışarıdan uygulamalara cevabında büyük çeşitlilik olduğu görülmüştür. Bütün bitki türleri bu bileşiklerin dışarıdan uygulanmasına cevap vermemekte, etkili konsantrasyon türden türe çeşitlilik göstermekte ve fazla uygulanması durumunda bazı bitkilerde büyüme inhibisyonu ya da verim kaybı meydana gelmektedir. Bu yüzden, prolinin tahıl stres toleransında teşvik edici olarak ticari kullanımı ve etkin uygulaması için bu bileşiğin etki mekanizmasını, optimum konsantrasyonunu ve uygun bitki gelişim safhalarını dikkatlice belirtmek gerekmektedir (Ashraf and Foolad, 2007).

Prolin ve kalsiyumun bitkilerin tuz stresine toleransını artırıcı yukarıda anlatılan etkilerinden yararlanarak biyoteknolojik çalışmalarla tuza toleranslı makarnalık buğday genotipleri üretmek önemlidir. Çünkü dünyada hızlı nüfus artışı ile birlikte bireysel ve toplumsal besin istekleri artmakta ve çeşitlenmektedir. Küreselleşen dünyada ise bilimsel çalışmalar ve teknolojik gelişmeler artan taleplere ve taleplerin çeşitliliğine cevap verebilmek için çaba harcamaktadır. Çalışmaların bir kısmı, insanoğlunun kaliteli ve verimli besin ihtiyaçlarını karşılayacak kaynakları elde etmek için yapılmaktadır. Bununla ilgili olarak, üretim konuları ile görevli kuruluşlar geleceğe dönük üretim ve tüketim tahminleri yapmakta ve üretimi arttırmayı amaçlayan çalışmaları hızlandırıcı çabalar içinde bulunmaktadır. Bu amaçla bölge ekolojik koşullarına iyi uyum gösteren, belirli streslere dirençli, verim ve kalite özellikleri iyi olan makarnalık buğday genotiplerinin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Buğdayın önemi, artan nüfusa çok önemli bir besin desteği sağlaması ve evolusyonu konusunda ki detaylı bilgiler EK-1’de verilmiştir.

Genetik değeri ve verim potansiyeli yüksek genotiplerin üretimde seçilerek kullanılması tarımda çok önemli bir yer tutmaktadır. Tuzlu topraklardaki çalışmalar, toprağın kimyasal ve fiziksel özelliklerinin heterojenliği ile karşı karşıya kalır (Munns and James, 2003). Bundan dolayı, tuza toleranslı genotiplerin geliştirilmesi için yapılan birçok deney ya *in vitro* (Arzani and Mirodjagh, 1999; Lee et al., 2003; Dasgupta et al., 2008) ya da kontrollü çevresel koşullar altında yapılmaktadır (Munns et al., 2000; Mohammadi-Nejad et al., 2008). Bitki doku kültürü teknikleri kullanılarak kontrollü koşullar altında gerçekleştirilen *in vitro* seleksiyon yöntemi ile populasyon içerisinde istenilen özelliklere sahip genotiplerin seçilmesi mümkün olabilmektedir. *In vitro* hücre ve doku kültürü teknikleri, klasik bitki biyoteknoloji programlarına yardımcı olarak geliştirilmiştir. Bitki doku kültürü, bitkilerin sahip olduğu totipotensi yeteneğinden yararlanılarak steril koşullarda, bitkilerden alınan hücre (meristem hücreleri, kallus hücreleri vb.), doku (çeşitli bitki kısımları) ve organ (üreme organları, çiçek, kök, embriyo, gövde vb.) kısımlarının yapay besiyerleri içerisinde geliştirilerek yeni bir birey oluşturulmasıdır. Bitkiden alınarak büyümesi için yapay ortama taşınan hücre, doku ve organ kısımlarına “eksplant” denir. Eksplantlardan amaca uygun şekilde organogenesis, embriyogenesis veya kallus dokusu teşvik edilerek *in vitro* koşullarda haploid bitki üretimi sağlanmaktadır.

Haploidler, somatik hücrelerindeki kromozom sayısı, ait oldukları bitki türünün gamet hücrelerinde bulunan kromozom sayısı kadar olan bitkilerdir. Meydana gelen bir haploid kendiliğinden ya da kromozom katlanması ile “doubled haploid” (DH) denen bitkiler haline dönerler. Buna karşılık, dihaploid bitkiler ($2n=2x$) bir ototetraploid ($4x$)’den elde edilen haploid bitkilerdir (Kasha and Maluszynsky, 2003). Haploidler düşük ihtimalle kendiliğinden oluşur ya da *in vivo* tozlaşma metotları (yaygın hibridizasyon, kromozom eliminasyonu, ışınlanmış polen ile tozlaşma vb.) ve olgunlaşmamış gametofitlerin *in vitro* kültürü gibi birkaç yöntem ile oluşturulabilmektedir. Gametik embriyogenesis bitkiler aleminde var olan embriyogenesisin farklı bir yoludur ve erkek (mikrospor veya olgunlaşmamış polen taneleri) ya da dişi (yumurta hücresi) gametofitlerin gametofitik gelişimden sporofitik gelişim yoluna doğru yönelmelerini sağlar. Genotipin klonal çoğaltımını

somaklonal varyasyon olmaksızın sağlayan somatik embriyogenesisten farklı olarak, gametik embriyogenesis haploid bitki oluşumu (kendiliğinden ya da indüklenen kromozom katlanması oluşmaksızın) ile sonuçlanır.

Mikrospor ya da polen embriyogenesis (androgenesis) hücresel totipotensinin en dikkate değer örneklerinden biridir (Reynolds, 1997). Geleneksel metotlar ile karşılaştırıldığında, gametik embriyogenesis homozigot hatların üretimini ve böyle hatların üretimi için gerekli zamanı azaltarak tek adımda heterozigot ebeveynden tam homozigot hatların oluşumunu sağlar. Geleneksel metotlar ile homozigot hatlar elde etmek, genetik uniformiteye ulaşmada tarımsal yöntemleri gerektiren ve oldukça zaman alıcı bir işlemdir (Morrison and Evans, 1987).

Anter kültürü birçok bitkide DH üretimi için sıkça seçilen metotlardan biridir (Şekil 1.1.). Peter ve Ilami (1972) antere ait bazı somatik dokuların, polenin sporofitik bölünmesinin oluşumunda önemli bir rol oynadığını ve anter duvarı aracılığı ile besinlerin difüzyonunun mikrospor embriyogenesisini etkileyen faktörlerden biri olduğunu kabul ederek “Duvar Faktörü” kavramını tanımlamışlardır. Polen embriyogenesisinde anter duvarının rolü üzerine yapılan çok sayıda çalışma, besin akışında bir bariyer görevi görmesinin yanı sıra yararlı ve inhibitör maddeleri de sağladığını göstermiştir (Heberle-Bors, 1985; 1989). Pulido vd. (2005) arpada mikrospor embriyogenesisinde her iki kültür sistemini (anter ve izole edilmiş mikrospor kültürü) kullanmışlar ve her iki yöntemin başlangıç safhalarının birbirine benzer olduğunu göstermişlerdir. Bu araştırmacılar ayrıca anter duvarının, mikrospor çevresinde ve kültür ortamında mevcut olan demirin (Fe) aşırı konsantrasyonlarını önleyen bir filtre olarak görev yaptığını belirtmişlerdir. Anter duvarının kadmiyum (Cd), çinko (Zn) ve nikel (Ni) gibi toksik elementlere karşı olan bu koruyucu rolü Krämer vd. (2000) ve Kupper vd. (2000) tarafından da gösterilmiştir.

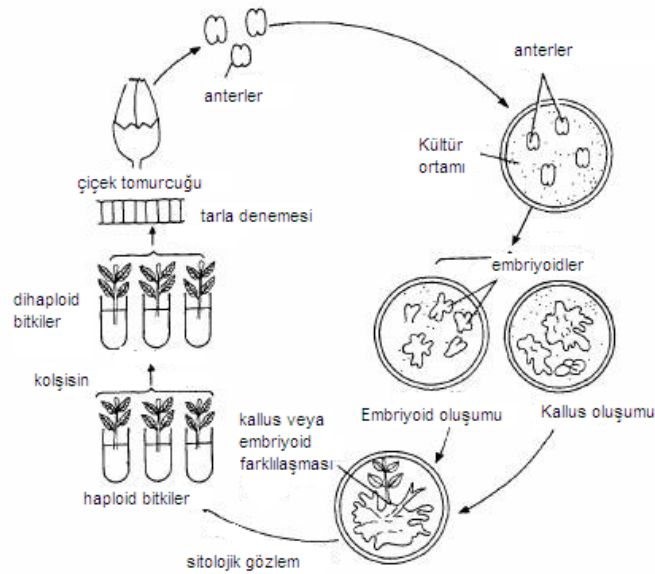
Mikrosporlar ön işlemden sonra ve kültür esnasında farklı yollar izleyebilmektedirler. Şöyle ki gelişimlerinin durması, olgun bir polen tanesi halini almaları, çok hücreli kallus benzeri yapı şeklini almaları ya da mikrospordan oluşan embriyolara dönüşmeleri mümkün olmaktadır (Hosp et al., 2007; Seguí-Simarro and

Nuez, 2008). Morfolojiden gen ifadesine kadar meydana gelen bazı değişiklikler, oluşumdan sonra embriyogenik gelişim esnasında mikrosporların ayırt edilmesini sağlamaktadır. Stres tarafından embriyogenik potansiyelin kazanılması ile birlikte hücrel cevaba bağlı stres tarafından, gametofitik gelişimin durdurulması, totipotent durumunun kazanılması ve hücrelerin sitoplazma ve çekirdek içererek yeniden oluşumuyla tersine farklılaşma meydana gelmektedir. Genişleme, büyük merkezi bir vakuolün varlığı ve pH'ın daha alkali hale gelmesi gibi morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler meydana gelmektedir (Hoekstra et al., 1992; Huang, 1996; Touraev et al., 2001; Maraschin et al., 2003).

Büyük merkezi vakuol daha sonra parçalara bölünmekte, radyal odaklı sitoplazmik iplikçikler tarafından dağıtılmakta, “yıldız-benzeri” olarak isimlendirilen yapılara dönüşmektedirler (Barnabás et al., 1991; Zaki and Dickinson, 1995; Zhao et al., 1996; Gervais et al., 2000; Obert and Barnabás, 2004). Bir sonraki faz, hücre bölünmesi ile ekzin duvarının içerisinde çok hücreli yapıların oluşumu ile karakterize edilmektedir. Sitolojik ve ultrayapısal gözlemler yıldız-benzeri mikrospordan çok hücreli yapıların oluşumunun, ilk bölünme simetrisi ve yavru hücrelerin yıkımı ile tanımlanan farklı gelişimsel yolları kapsadığını göstermektedir (Maraschin et al., 2005). Raghavan (1997)'a göre mikrospor kaynaklı embriyo oluşumunun farklı yolları vardır:

1. Vegetatif hücrenin tekrarlanan bölünmesi. Sitokinezsiz çekirdek bölünmesi ile birçok çekirdekli pro-embriyo oluşabilir. Kallus yerine embriyo elde edilebilir.
2. Generatif hücrelerin ya da generatif ve vegetatif hücrelerin her ikisinin bölünmesi. Hücre füzyonu haploid olmayan kromozom sayıları ile sonuçlanabilir.
3. Mikrosporların simetrik bölünmesi, mikrosporlar ilk polen mitozundan önce toplandığında embriyo oluşumunun temel bir yoludur. Bir yolun diğerleri üzerine hakimiyetinin gelişim safhası ve ön işlemden uygulanan stres çeşidi gibi farklı faktörlere bağlı olduğu gösterilmiştir (Zaki and Dickinson 1995; Rihova and Tupy 1999; Kasha et al., 2001).

Daha sonraki aşamada, embriyo benzeri yapılar ekzin duvarının dışına çıkmaktadır. Generatif bölgede kırılma noktası ile polen porunun karşı tarafına yerleşmektedir (Seguí-Simarro and Nuez, 2008). Embriyo benzeri yapılar etrafındaki hücrelerin periklinal bölünmesi sonradan meydana gelmekte ve epidermis farklılaşmasına neden olmaktadır (Telmer et al., 1995; Yeung et al., 1996). Daha sonra embriyo benzeri yapılar, zigotik embriyo yoluna benzer şekilde yürek ve torpedo şekli safhalarına geçmektedir (Hause et al., 1994). Yine anter kültüründe E-tipi (kallus bazen embriyoide benzer, kompakt, yoğun hücreleri ile beyaz-sarı renkli ve şekli globulardan çok loblu yapılar arasında değişen) ve W-tipi (kallus çoğunlukla gevşek, sulu, saydam hücreli) olarak adlandırılan iki farklı kallus yapısı tanımlanmıştır (Marsolais and Kasha, 1985) ve bu yolla Türk arpa genotiplerinde kallus üretiminde E-tipi kallusun bitki regenerasyonundaki önemi vurgulanmıştır (Savaşkan vd., 1999). Kallus ve embriyolar elde edildikten sonra onların bitkilere dönüşmeleri kaçınılmaz bir sonuç değildir. Yüksek embriyo oluşum oranlarında bile düşük bitki regenerasyon miktarları olduğunu gösteren bir çok rapor vardır (Wedzony et al., 2009). Bitki regenerasyonundan önce genellikle gametoklonal varyasyon ihtimalini arttıran kalluslaşma meydana gelmektedir (Gonzalez-Melendi et al., 2005; Kasha, 2005; Shim et al., 2006; Seguí-Simarro and Nuez, 2008).



Şekil 1.1. Anter kültürü ile haploid bitki üretim aşamaları ve dihaploid bitkilerin üretilmesi (Gupta, 2009)

Kallus kültürleri sırasında kendiliğinden meydana gelen mutasyon oranı doğadakinine göre çok fazladır (Phillips et al., 1994; Jain, 2001). Ayrıca, kallus kültürü kontrollü koşullarda gerçekleşmekte ve bu gibi koşullar istediğimiz özellikler yönünden seçim yapmamızı kolaylaştırmaktadır. Tek hücre seviyesinde; tuz, herbisitler, patojenler vb. faktörlere karşı dayanıklılığa göre yapılan seleksiyonlar sonucu, tuzluluğa, kuraklığa vb. stres faktörlerine dayanıklı veya toleranslı bitkiler üretilebilmektedir. Genetik olarak karmaşık herhangi bir özellik için homozigot genotiplerle çalışma önemli bir avantajdır (Arzani and Darvey, 2001; 2002). Bu özellik tuzluluk için geçerlidir. Çünkü genotip üzerindeki çevresel etki toprak tuzluluğunun heterojeniteliği nedeniyle oldukça büyük olabilmektedir. Bu yüzden, F1 hibritlerinin tuza toleranslı ebeveynlerinden anter kültürü yoluyla elde edilmiş doubled haploid hatlar, bitki kültürlerinin tuz toleranslarının daha da geliştirilmesinde kullanılmaktadır (Kenny and Caligari 1996; Senadhira et al., 2002). Tuza toleranslı genotiplerin üretiminde kullanılan en başarılı yöntemin doubled haploid metot olduğu belirtilmiştir (Miha et al., 1996; Senadhira et al., 2002). Çünkü geleneksel metotlar ile karşılaştırıldığında genetik varyasyonda artış, dominant varyasyonunun olmayışı ve büyük replikasyon olanakları sayesinde çevre koşullarından daha az etkilenmeler doubled haploid metodun avantajları olarak sayılmaktadır. Böylece istenilen genotiplerin belirlenmesi daha kolay olmaktadır (Snape, 1989). Bu sebeple tuzluluğa dayanıklı ve toleranslı makarnalık buğday bitkilerinin üretilmesinde anter kültür tekniğinden yararlanılabilir. İnsanların temel gıda gereksinimlerinin karşılanması, tarımsal alanların en iyi şekilde kullanılarak tarımsal üretimin arttırılmasına bağlıdır.

Buğday genotiplerinin tuz toleransları hakkında bilgi sahibi olmak tuz stresine maruz alanlar için genotip seçiminde oldukça önemlidir. Genotip seçimi ise öncelikle her genotip veya F1 generasyonuna ait bitkilerin değişen ortam koşullarında, anter kültürüne cevabı, kallus üretim kapasitesi ve bitki regenerasyon oranı ile belirlenmektedir (Ximing et al., 1994; Savaşkan vd., 1999).

Bu çalışmada öncelikle 4 makarnalık buğday genotipinin (*Triticum durum* Desf. cvs. “Kunduru 1149”, “Kızıltan 91”, “Mirzabey 2000”, “Ç 1252”) anter kültürüne cevabı

ve kallus üretim kapasiteleri ele alınmıştır. Tuzlu koşulları meydana getiren en önemli abiyotik etmen NaCl'dir. Bu nedenle anter kültürüne cevabı araştırılan bu 4 makarnalık buğday genotipinin çeşitli NaCl konsantrasyonlarında ve NaCl ile birlikte sabit miktarda Ca^{+2} ve prolin içeren ortamlarda regenerasyon yeteneklerinin araştırılması ve birbirleri ile karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bunun için, günümüze kadar yapılan NaCl'nin regenerasyon yeteneğine etkisi araştırmalarının aksine bu çalışmada Na^{+} , Ca^{+2} ve prolin ilaveleri regenerasyon ortamına yapılmıştır. Ayrıca gerek kalsiyum ve gerekse prolinin NaCl ile ayrı ayrı kombine oldukları koşullarda regenerasyon üzerine olan etkileri ve genotipler üzerindeki etki dereceleri belirlenmeye çalışılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Anter Kültürü ve NaCl ile İlgili Çalışmalar

J'Aiti vd. (1999) yaptıkları çalışmada toplam 18 makarnalık buğday genotipi ("ACSAD 65", "Anouar", "Belbachir", "Cocorit", "Isly", "Jawhar", "Jori", "Karim", "Marzak", "Massa", "O.Rbia" (Morocco), "Sarif", "Sebou", "Tassaout", "Tensift", "O.Rbia", "O.Ruf" ve "Sabil-1") kullanmışlardır. İnkübasyondan sonra (+4°C de 48 saat), bir genotipten tek çekirdekli mikrospor safhasında bulunan minimum 500 anter, tetraploid buğday anter kültürü için oldukça etkili olan C17 kültür ortamına alınmıştır. Ayrıca 3 durum buğdayı çeşidi "Sarif", "Isly" ve "Cocorit" anter cevabı üzerine ovaryumlarla hazırlanan ortamın etkisini araştırmak için kullanılmıştır. Ovaryumlar anterlerin toplandığı aynı başaklardan alınmıştır. Her ovaryum aynı çiçekten alınan 3 anterin yakınına konmuştur. "Cocorit", "Isly", "Jori", "Massa" ve "O.Ruf" çeşitlerinin tümü anter kültüründe başarısız çeşitler olarak bulunmuştur. Diğer taraftan, "Sarif" çeşidi yüksek oranda embriyo ve kallus oluşturmuştur (% 13). Test edilen çeşitlerin birçoğu regene bitki oluşturamamıştır. "Sabil-1" bir yeşil bitki üretirken, "Sarif" ve "Belbachir" çeşitleri sadece albino bitkiler üretmişlerdir. Diğer uygulamada ise kültür ortamında ovaryumların varlığının anterlerin cevabını arttırdığı görülmüştür. "Cocorit" ve "Isly" çeşitlerinde anter kültürüne olan uygunsuzluk ortadan kaldırılmış ve "Sarif" çeşidinde kallus ve embriyo oranı % 13 ten % 15'e çıkarılmıştır. Bununla beraber, ovaryumların ve anterlerin birlikte kültür edilmesinin yeşil bitki regenerasyonu üzerine etkisi olmamıştır.

Arzani ve Mirodjagh (1999), 28 durum buğdayı (*Triticum turgidum* L. var. durum) çeşidinin olgunlaşmamış embriyo kültürü, kallus üretimi ve *in vitro* tuz toleransına cevabını araştırmışlardır. Çeşitlerin tuza toleransını değerlendirmek için, büyüyen kalluslar her 4 haftada bir NaCl'nin farklı konsantrasyonlarının bulunduğu (% 0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5, 1.8 ve 2.1 w/v) kültür ortamlarına alınmıştır. Çeşitlerin olgunlaşmamış embriyolardan kallus oluşum oranlarını karşılaştırmak için, kallus oluşum sıklığı ile kallusun taze ağırlığı temel alınmıştır. Tuz toleransı için, nisbi taze ağırlık miktarı ve kallusun nekrozis yüzdesi kullanılmıştır. Çeşitler arasında,

olgunlaşmamış embriyolardan regenerasyon potansiyeli oranında önemli farklılıklar bulunmuştur. Nispi taze ağırlık miktarı, değerlendirme yapmak için, çeşitlerde kallus oluşum sıklığından daha önemli bulunmuştur. Nispi taze ağırlık oranı “Mexical-75” ve “Omrabi-5” çeşitlerinde 1.23’ten 14.65 g’a yükselmiştir. “PI 40 100” ve “Dipper-6” çeşitlerinden elde edilen kallusların, *in vitro* koşullar altında tuza toleransta diğer çeşitlerle karşılaştırıldığında üstünlük gösterdiği bulunmuştur.

Akkeçeci (2001) yaptığı çalışmada “Panda”, “Seyhan-95”, “Bal Atilla”, “Marmara-86” ekmeklik buğday çeşitleri kullanmıştır. Çalışmada çeşitlere ait olgunlaşmamış embriyoların *in vitro* kültüründe, steril ortamda (MS + 2 mg/l 2,4-D) kallus oluşum oranları ve kallus ağırlık artışları belirlenmiştir. Elde edilen kalluslar, stres faktörü olarak, farklı oranlarda (0, 1.5, 3.0, 4.5, 5.5, 7.0 g/l) NaCl içeren sıvı MS (MS + 2 mg/l 2,4-D) ortamında, daha sonra da stres faktörü içermeyen sıvı MS ortamında kültüre alınmıştır. Buradan elde edilen kalluslar, aynı oranlarda NaCl içeren katı MS ortamında, bir kez daha stres faktörüne maruz bırakılmış ve bütün ortamlarda kalluslardaki ağırlık artışı ile stres faktörüne bağlı olarak kallus ağırlığında meydana gelen azalma miktarları tespit edilmiştir. Katı stres ortamından alınan kalluslar MS ortamına 1 mg/l BAP + 1 mg/l Kinetin ilavesi ile hazırlanan regenerasyon ortamına aktarılmış ve kallusların bu ortamdaki gelişmeleri incelenmiştir. Denemeye alınan çeşitlerin hiçbiri tuzluluğa toleransta önemli bir farklılık göstermemiştir. Ancak 1.5 g/l NaCl içeren stres ortamında “Seyhan-95” çeşidi, 3 g/l NaCl içeren ortamda ise “Panda” çeşidinin kallus ağırlık artışıdaki azalma daha az olmuştur. NaCl dozlarının 4.5, 5.5 ve 7.0 g/l’ye çıkarılması ile kallus ağırlık artışında meydana gelen azalmalar bütün çeşitlerde % 75’in üzerinde olmuştur. Araştırma sonucunda; kallus oluşum oranı bakımından çeşitler arasında önemli farklılıklar olduğu belirlenmiştir. Stres faktörünün artışına bağlı olarak çeşitlere ve dozlara göre kallus ağırlık artışı da önemli ölçüde azalmıştır. Buna göre çeşitlerin NaCl stres faktörüne tepkilerini kallus kültürleri aracılığı ile değerlendirmenin mümkün olabileceği anlaşılmıştır.

Doğramacı-Altuntepe vd. (2001), durum buğdayının (*Triticum turgidum* L., 2n=4x=28; AABB) 10 çeşidinin (“Gediz-75”, “Sham-1”, “Cosmidor”, “Kunduru-1149”, “Ege-88”, “Çakmak-79”, “Diyarbakır-81”, “Fenike”, “Dicle-74” ve

“Kızıltan-93”) anter kültürüne cevabını araştırmışlardır. Her deneme bu 10 genotip, 2 g/l fruktoz, 4 g/l glukoz, 50 g/l sükroz ve 130 g/l fikol ile modifiye edilmiş 4 başlangıç kültür ortamı [BAC1 (Marsolais ve Kahsa, 1985), BAD-1, BAD-3 (Trottier vd., 1993) ve M-42 (Kao vd., 1991)] ve 3 büyüme koşulu (sera, tarla ve büyüme odası) kullanılarak kurulmuştur. Donör bitkiler serada 20-23°C sıcaklıkta, % 60 nem ve 16 saat gündüz periyodunda ve tarla koşullarında yetiştirilmiştir. Olgunlaşmamış başaklar 7 gün +4°C sıcaklıkta soğuk ön işleme tabi tutulmuştur. Daha sonra % 70 etil alkol, % 1 sodyum hipoklorit, Tween 20 ve saf su ile yüzey sterilizasyonları yapılan başaklardan alınan anterler 5 ml’lik kültür ortamlarına 20’şer adet olacak şekilde ekilmiş ve 28°C sıcaklıkta karanlıkta inkübe edilmiştir. Kültürlerin her hafta kallus ve embriyoid gelişimleri gözlenmiştir. Oluşan kallus ve embriyoidler (1-2 mm), 30 g/l sükroz, 17.5 g/l glukoz ve 8 g/l agar içeren BAD-1 regenerasyon ortamına alınmıştır. Bu kültürler 7-10 gün oluşum koşullarında tutulduktan sonra 25°C sıcaklık ve 16 saat gündüz periyodu koşullarına ayarlanmış inkübatöre alınmıştır. Bitki regenerasyonu meydana geldikten sonra oluşan fideler 2 g/l kinetin, 1 g/l IAA ve 30 g/l maltoz içeren MS ortamına transfer edilmiştir. Genotiplerden (10 tane) alınan toplam 86.400 anterin % 0.49’u (424 anter) başarılı olmuştur. En iyi genotip % 1.28 kallus üretimi ile “Dicle-74” olurken en düşük oran % 0.06 ile “Çakmak-79” çeşidinde görülmüştür.

Poustini ve Siosemardeh (2004) çalışmalarında 30 buğday çeşidinin (*Triticum aestivum* L.) NaCl tuzluluğuna cevabını onların yaprak ve tane K^+/Na^+ oranı ile iyon seçicilikleri açısından değerlendirmişlerdir. Saksı denemelerini 3 tekrarlı tesadüf blokları şeklinde gerçekleştirmişlerdir. NaCl’li ve NaCl’siz çeşme suyu, 16 ds m^{-1} EC toprak ekstraktı tuzluluk uygulamaları için kullanılmış ve kök uzamasının başlangıcından itibaren bitkilere uygulanmıştır. Tane kuru ağırlığı ve bazı iyonik özellikler arasında önemli korelasyon olduğu gözlenmiştir. Üstelik yüksek yaprak Na^+ konsantrasyonunun tane kuru ağırlığına olumsuz etkileri, tane dolum oranı ve/veya süresi ile ilgili süreçler tuz toleransı bakımından tane verimi ile ilgili olduğunda daha etkili olabilir. Bu durum büyümenin üreme safhasının vegetatif safhadan bağımsız olarak tuza toleranslı olmasına izin verebilir. “İnia-66” çeşidi bu duruma bir örnek olarak gösterilebilir. Bu daha uygun kuru ağırlık bölümlene

modeli sayesinde çeşit yüksek oranlarda tuza tolerans özelliği gösterir. Çeşitler arasında yapılan ortalama karşılaştırmaları “Roshan” çeşidi ve bunu izleyen diğer 10 çeşidin yüksek tuz toleransına sahip olduğunu göstermiştir. Bu çeşit en düşük yaprak Na^+ konsantrasyonuna, topraktan taneye iyon geçişinde en yüksek K^+ karşı Na^+ seçiciliğine ve en yüksek tane K^+/Na^+ oranına sahiptir. “Roshan” çeşidinin tane kuru ağırlığı tuza duyarlı ve en düşük tane kuru ağırlığına sahip olan “Ghods” çeşidinden 7.5 kat fazladır. Bu sebeple önceki 11 çeşit tamamen tuza toleranslı çeşitler olarak düşünülebilir. “Kharchia” çeşidinde, tuzluluk tane K^+/Na^+ oranını ve iyon seçiciliğini düşürmemiş fakat tane dolum periyodunu düşürmüştür.

Wojnarowicz vd. (2004) şekerler ve polioller, hem genel androgenesis verimi hem de albinizm ile ilişkili plastid yapısı üzerine olan etkilerini belirlemek için arpa (*Hordeum vulgare* L.) anter kültürünün farklı safhalarında test etmişlerdir. Ön işlem esnasında, ortamdaki osmotik düzenlemenin test edilen osmolitin konsantrasyonuna ve çeşidine bakılmaksızın mikrospor embriyogenesi için yararlı olduğu bulunmuştur. Her maddenin etkisi çalışılan parametrelere bağlı olarak farklılık göstermekle birlikte mannitol (300 mOsm/kg), sorbitol (180 mOsm/kg), PEG (240 mOsm/kg) ve sükroz (180 mOsm/kg) kullanımı yeşil bitki üretimi açısından en iyi sonuçları vermiştir. Benzer olarak, anter kültürü sırasında ortamda osmotik basıncın düzenlenmesinde kullanılan osmolite bağlı olarak çeşitli etkileri vardır. Mannitol (364 mOsm/kg) kullanımı kültüre alınan 100 anterden 139.6 yeşil bitki (regenere bitki) üretimini sağlayarak en iyi sonucu göstermiştir. Plastidler hem ön işlem hem de kültür esnasında elektron mikroskobu ile incelenmiştir. Mannitol ve PEG varlığında, plastidler işlemin hiçbir safhasında nişasta biriktirmemişlerdir. Fakat mikrospordan oluşan embriyolarda kloroplastlara farklılaşmaya başlamışlardır. Sorbitol ve sükroz kullanıldığında, plastidlerin farklılaşması zayıf fakat nişasta birikimi büyük miktarlarda olmuştur. Bu da bu şekerlerin mikrospor ve mikrospor benzeri yapılar ile metabolize edildiğini düşündürmektedir. Bununla beraber, nişasta birikimi albinizm oluşumu ile ilişkili bulunmamıştır. Bu sonuçlar, arpada osmotik düzenlemenin osmolitin çeşidine bağlı olmaksızın mikrospor gelişimini gametofitik yönden sporofitik yöne doğru kaydırabileceğini göstermektedir. Ek olarak, ön işlem sırasında mannitolün embriyo gelişimi için en uygun osmolit olduğu bulunmuştur.

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

Lazaridou vd. (2005) 3 arpa (*Hordeum vulgare* L.) çeşidinin (“Niki”, “Karina”, “Thermi”), bir F1 hibrit (“Niki-Thermi”), iki F2 populasyonu (“Niki-Thermi”, “Niki-Karina”) ve iki F3 populasyonunun (“Niki-Thermi”, “Niki-Karina”) anter kültüründe embriyoid oluşumu ve bitki regenerasyonunu 14 ve 28 gün soğuk ön işlem uygulaması kullanarak iki katı kültür ortamında araştırmışlardır. Kültür ortamları (N6 ve FHG) içerik ve karbon kaynağı (FHG’de maltoz, N6’da sükroz) bakımından birbirinden farklı hazırlanmıştır. Embriyoid miktarı ve yeşil bitki regenerasyonunun hem kültür ortamı kompozisyonuna hem de soğuk ön işlem uygulamasına bağlı olduğu bulunmuştur. FHG kültür ortamı ve 28 gün soğuk ön işlem uygulamasının haploid embriyo oluşumu ve yeşil bitki üretimi için en etkili kombinasyon olduğu belirtilmiştir. Buna ek olarak yeşil bitki üretiminin genotipe bağlı olduğu ve en yüksek yeşil bitki üretiminin “Thermi” çeşidi ve “Niki-Thermi” F1 hibritinde meydana geldiği rapor edilmiştir. Anter kültüründe yüksek hatta orta oranda

embriyoid oluşumuyla ebeveynler, F1 hibritlerinden ya da F2 generasyonundan yeşil bitkilerin etkin üretimine neden olabilmektedir.

Akhtar (2006) çalışmasında 4 buğday varyetesinin (“Arz”, “Pak-81”, “LU-26” ve “Pavon”) kallogenesis ve organogenesis yeteneklerini baz alarak sodyum klorid (NaCl) stresine toleransları arasındaki farklılıkları belirlemeyi amaçlamıştır. Doku kültürü için 50, 100, 150 ve 200 mM NaCl eklenerek hazırlanan modifiye Murashige ve Skoog (MS) ortamı kullanılmıştır. Çoğu varyetede 4 haftalık inkübasyondan sonra sağlıklı kalluslar gelişmiştir. İnkübasyonun uzaması genellikle kallus oluşum etkinliğini azaltmıştır. Bu kallusun sertleşmesi ve bu sebeple besin alım etkinliğini azaltması ile ilişkili olabilir. Kültür ortamına çeşitli konsantrasyonlarda eklenen tuz kallus oluşum oranını ve regenerasyonu azaltmıştır. Sonuçlar tuzluluk stresi altında kallus oluşumu ve regenerasyon olaylarında farklı buğday varyeteleri arasında çarpıcı farklılıklar olduğunu göstermiştir. “LU-26” % 76 kallus oluşum oranı ile en toleranslı çeşit olarak bulunmuştur. Bunu “Pavon” (% 51) , “Pak-81” (% 34) ve “Arz” (% 25) çeşitleri izlemektedir.

Niazi vd. (2007) yaptıkları çalışmada K/Na oranı ve nem içeriğinin NaCl stresi altında buğday (*Triticum aestivum* L. cv. “Lu-26”) büyümesine olan etkisini araştırmışlardır. Bitkiler hidroponik (su kültürü) koşullarda iki tuzluluk seviyesinde (0 ve 50 mM NaCl) büyütülmüşlerdir. Kalsiyum 3 ve 6 mM $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ şeklinde eklenmiştir. Bitkiler 30 gün sonra toplanmıştır. Uygulamalar büyüme ve iyonik ilişkiler üzerine önemli derecede ($P < 0.01$) etki göstermiştir. Kök ve gövde yaş ağırlığı CaSO_4 uygulamasının tuzlu ortamda 3 mM’dan 6 mM’a yükseltilmesi ile % 41 ve 44 oranlarında artmıştır. Tuzlu koşullardaki kök kısmi su içeriği $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ uygulaması ile tuzsuz ortamdakiler ile karşılaştırıldığında azalma göstermiştir. Kök/gövde oranı tuzsuz ortamda $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ uygulamasının (3mM-6mM) arttırılması ile % 29 oranında azalmıştır. Kök/gövde oranı 3 mM $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ uygulamasında tuzlu ortamda tuzsuz ortama göre % 29 artmıştır. Bununla beraber 6 mM $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ kök/gövde oranını tuzlu ortamda tuzsuz ortama göre % 18 arttırmıştır. Artan K^+/Na^+ oranının, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ miktarının tuzlu ortamda 3 mM’dan

6 mM'a yükselmesi sonucu gövde kuru ağırlığının % 72 artışında belirgin bir etkisi vardır.

Kondic- Šipka vd. (2007) rastgele seçilen 14 buğday (*Triticum aestivum* L.) F1 hibritinin androgenik ve regenerasyon yeteneklerini analiz etmişlerdir. Donör bitkiler tarla koşullarında yetiştirilmiş ve başaklar mikrosporlar orta tek çekirdekli safhada iken alınmıştır. Anterler modifiye Potato-2 indüksiyon ortamında *in vitro* kültüre alınmışlardır. NS111-95/Ana hibridi androgenik kapasite (% 33) ve kallus üretimi (% 119) için en yüksek ortalama değere sahipken, NS92-250/Tiha bu özellikler için (% 9 ve 21) en düşük değere sahip hibrit olarak bulunmuştur. Oluşan embriyogenik kalluslarda bitki regenerasyonu için modifiye 190-2 ortamı kullanılmıştır. En yüksek yeşil bitki oluşumu % 21.3 ile NS111-95/Sremica'da görülmüştür. Bu hibrit izolasyon için kullanılan başak başına 12.8 doubled haploid (DH) hat üretimiştir. Diğer genotiplerde başak başına DH hat üretim sayısı 1 (30-Sc.Smoc.88-89/Hays-2)-11.2 (NS111-95/Ana) arasında değişim göstermiştir. Rastgele seçilen genotiplerin yarısı kadarı yüksek yeşil bitki regenerasyon yeteneği ve başak başına yüksek bir DH hat üretimi göstermiştir. Araştırmacılar, *in vitro* anter kültürü homozigot buğday hatlarının hızlı üretimi için ıslah programlarında başarıyla kullanılabilir sonucuna varılabileceğini belirtmişlerdir.

Ahmad vd. (2007) 2 Hindistan pirinç genotipinin ("Basmati-370" ve "Basmati-Kashmir") bir aylık olgun kalluslarını 50 ve 100 mol m⁻³ NaCl ya da % 10 ve 18 PEG-8000 solüsyonu ile hazırlanan iki izo-osmotik konsantrasyona (-0.57 MPa ve -0.74 MPa) tabi tutmuşlardır. Her iki genotip te sadece düşük seviyedeki strese toleranslıdır ve -0.74 MPa'da büyüme şiddetli bir biçimde durmuştur. Her iki genotipin stres toleransı derecesi PEG'in yaratmış olduğu streste NaCl'nin yaratmış olduğu stresten daha fazla olmuştur. Kallusun kısmi büyüme oranı her iki stres altında da düşüş göstermiştir. Bununla beraber, kallus kuru ağırlığı için bunun tersi durum söz konusudur. Kallus dokusunun sodyum (Na⁺) içeriği sadece NaCl stresi altında artmıştır. Tuz kaynaklı stres K⁺ ve Ca⁺² içeriğini düşürmüştü fakat PEG kaynaklı stres bu iyonların miktarını arttırır. Yüksek seviyelerdeki PEG stresi prolin içeriğini NaCl stresine nazaran oldukça fazla miktarda arttırmıştır. Her iki abiyotik streste de kallus dokusunun su ve osmotik potansiyeli düşmüş fakat turgor

potansiyeli artmıştır. “Basmati-370” her iki stres durumunda da “Basmati-Kashmir”den daha toleranslı olarak düşünülmüştür. Çünkü büyümesinde ve kuru ağırlığında daha az düşüş meydana gelmiştir. Üstelik “Basmati-370” “Basmati-Kashmir” ile karşılaştırıldığında daha fazla miktarda katyon, serbest prolin biriktirmiş ve maksimum turgor sürekliliği göstermiştir. Sonuçta hücresel düzeyde NaCl’nin yarattığı osmotik stres tolerans mekanizmasının inorganik çözünenlerin daha fazla iyonik birikimi ile bağlantılı olduğu bulunmuştur. PEG kaynaklı osmotik stres toleransı serbest prolin birikimi ile sağlanmaktadır. Prolin sitozolde bulunan önemli bir osmolit olarak nitelendirilir.

Lardet vd. (2007) *Hevea brasiliensis*’in friable (süngerimsi) embriyogenik kallus hatlarına bir dondurma tekniği uygulamışlardır. Kriyopreservasyon (dondurma) işlemi Engelmann ve arkadaşlarının rapor ettiği şekilde uygulanmıştır. Bu işlem 2 temel adımdan oluşmaktadır. Birincisi donmadan koruyucu uygulama, diğeri ise dondurma adımıdır. Bu çalışma da dondurma işleminden önce ön-kültürdeki CaCl_2 konsantrasyonu 9 mM’dan 1 mM’a düşürüldüğünde kallus büyümesinin arttığı görülmüştür. Embriyo regenerasyonu için 1 mM CaCl_2 konsantrasyonun optimum değer olduğu bulunmuştur. Dondurma yönteminin etkisi 39 bağımsız hatta değerlendirilmiş ve hatların çoğunluğunda embriyogenesis ve regenerasyona etki etmediği görülmüştür. Ön-kültür ortamında CaCl_2 konsantrasyonunun azalması kallus kalsiyum içeriğinde ani bir düşüşe sebep olmuştur. Bu da ön-kültür ortamındaki kalsiyum konsantrasyonu ile kallusun içsel kalsiyum içeriği arasında doğrudan bir bağlantı olduğunu göstermektedir. Bu ayrıca soğuğa toleransta doku kalsiyum içeriğinin bir rolü olduğunu da göstermektedir.

Broughton (2008) yaptığı çalışmada ovaryum ko-kültür kullanarak Avustralya yazlık buğday çeşitleri (“Tammarin Rock” ve “Westonia”) için bir anter kültürü yöntemi geliştirmiştir. Donör bitkiler 18/13°C’de (gündüz/gece) 12 saat gündüz fotoperiyodunda kontrollü koşullarda yetiştirilmiştir. Ovaryumların başlangıç oluşum ortamına eklenmesi ile embriyo-benzeri yapıların (ELS) ve yeşil ve albino bitkilerin üretimi önemli derecede artmıştır. Başlangıç ortamına 5 ovaryum eklendiğinde, ELS başak başına ortalama miktarı 7.6’dan 50.1’e ve yeşil bitkiler 0.6’dan 8.9’a

yükselmiştir. Bununla beraber 10 ovaryum eklendiğinde ne ELS ne de yeşil bitki üretiminde artış görülmemiştir. Kinetin ve 2,4-D büyüme düzenleyicilerinin kombinasyonu IAA ve BA ile karşılaştırılmıştır. ELS veya yeşil bitki sayısında önemli bir farklılık bulunmamıştır. Fakat IAA ve BA ile önemli miktarda az albino bitki üretilmiştir. 8 ek çeşit (“Calingiri”, “Camm”, “Carnamah”, “Datatine”, “EGA 2248”, “EGA Bonnie Rock”, “Stylet” ve “Wyalkatchem”) başlangıç ortamına 5 ya da 10 tane ovaryum eklenmesi suretiyle test edilmiştir. Dokuz varyeteden elde edilen yeşil bitki sıklığı başak başına 0.3’ten 33.0’e yükselmiştir. Bu deneyde yeşil bitkiler toprağa ekilmiş ve kromozom katlanma oranını belirleyebilmek için olgunlaşınca kadar büyütülmüşlerdir. Ploidi gözle görülür bir biçimde belirlenmiş ve tohum veren bitkiler doubled haploid (69), steril bitkiler haploid (39) olarak sınıflandırılmıştır.

Asakaviciute (2008) Litvanya arpası ve patates kültürlerinde doubled haploid elde etmek için anter kültür yöntemi kullanmıştır. Bu kültürler embriyo benzeri yapılardan doğrudan üretilmiştir. Yeni oluşan bitkiciklere ve diğer morfogenetik faktörlere bakılarak erkek gametten bitki oluşum potansiyelleri belirlenmeye çalışılmıştır. Yeşil DH bitkicikleri çalışılan 10 kültürden 3 litvanya arpa kültürlerinde (“Aidas”, “Alsa” ve “Auksiniai”) gözlenmiştir. En yüksek embriyo benzeri oluşum 100 pozitif anterde 580.0 embriyo benzeri yapı “Auksiniai 3” de ortaya çıkmıştır. Patates kültürlerinden “Nida” pozitif sonuç açısından en yüksek orana sahiptir (% 17.4). En yüksek embriyo oluşumu patates kültürlerinden “Aista” da gözlenmiştir (100 pozitif anterde 222.5 embriyo benzeri yapı). Anter kültüründe doğrudan mikrospor embriyogenezi ile Litvanya patateslerinin yeniden oluşumu bu çalışmada incelenmiştir. Fidecikler çalışılan 5 farklı kültürün yalnız üçünden elde edilmiştir (“Goda”, “Nida” ve “Aista”). “Aista” kültürü embriyodan geliştirilen pozitif 100 anterde 74.5 bitki gelişmiştir.

Rahman vd. (2008) tuzluluğun buğdayda (*Triticum aestivum*) 4 çeşidin (“Zarghoon”, “Zarlasht”, “Zardana”, “Raskoh”) çimlenme ve erken fide büyümesi üzerine etkisini araştırmışlardır. Tuzluluk uygulamaları ölçümleri ψ 0.00, -2.457, -4.914, -9.828 ve -14.742 bar deiyonize suya NaCl ilave edilerek meydana getirilmiştir. Bütün çeşitlerde su alımı ve çimlenmede düşüşler meydana gelmiştir. -9.828 ve -14.742

gibi yüksek osmotik potansiyellerde su alımı kontrol gurubuna göre azalmıştır. Su alımındaki azalma kontrol gurubu ile karşılaştırıldığında “Raskoh”, “Zardana”, “Zarghoon” ve “Zarlasht” çeşitlerinde sırasıyla % 51.09, 36.55, 42.82, 35.35 oranlarında meydana gelmiştir. Su alımındaki düşüş en az “Zarlasht” ve en fazla “Raskoh”ta olmuştur. NaCl konsantrasyonundaki artış bütün buğday çeşitlerinde kök ve gövde uzunluğunu ve biyomasi azaltmıştır. Gövde büyümesindeki azalma kök büyümesinde ki azalmadan daha fazla olmuştur. Kök ve gövde uzunluğunda ki maksimum azalma -14.742 bar osmotik potansiyelinde “Zardana” çeşidinde % 80 ve 81 oranlarında meydana gelmiştir. Tuz konsantrasyonunun artması erken fide büyümesini de etkiler. Araştırılan çeşitler içinde “Zarlasht” çeşidinin çimlenme safhasında daha duyarlı olduğu gözlenmiştir. Bununla beraber, fide safhasında oldukça iyi bir performans göstermiştir.

Redha ve Talaat (2008) 3 heksaploid buğday (*Triticum aestivum* L.) genotipi anter kültüründe DH ile karşılaştırıldığında çok daha yüksek oranda albino regenerantlar üretmişlerdir. İnokülasyondan önce yeşil bitki regenerasyonunu arttırmak amacıyla fikor, kolşisin ve maltoz ayrı ayrı, ikili ya da kombine şekilde kültür ortamına eklenmiştir. Bütün genotiplerde maltoz uygulaması ile sükroza nazaran daha fazla yeşil bitki üretimi görülmüştür. Anter kültür ortamında kombine edilen üç kimyasal yeşil bitki regenerasyon miktarını azaltmış ya da maltoz uygulaması ile karşılaştırıldığında yeşil bitki regenerasyon miktarında önemli bir farklılık meydana getirmemiştir. DH’lerde kolşisin içeren bütün ortamlarda kültür edilen 100 anter başına daha az embriyo-benzeri yapı elde edilirken 100 embriyo-benzeri yapı başına daha fazla sıklıkta yeşil bitki elde edilmiştir. Yeşil bitki regenerasyonundaki artış daha kaliteli embriyo oluşumundan kaynaklanır. Embriyo-benzeri (100) yapı başına yeşil bitki sayısındaki küçük artışlar “ICR 4” ve “V-15” te kolşisin içeren ortamda meydana gelmiştir. Anter kültür cevabındaki genotipik farklılıklar kültüre alınan 100 anterden elde edilen embriyo-benzeri yapılar baz alınarak gözlenmiştir (“V-37” de atmış, “DH” de azalmış ve “ICR 4” ve “V-15” te sükrozlu kontrol gurubu ile karşılaştırılan her üç kimyasal içeren ortamda nerdeyse aynı kalmıştır).

Soriano vd. (2008) yaptıkları çalışmada buğday anter kültüründe embriyo üretimini geliştirmeyi amaçlamışlardır. Üç butanol alkol, n-butanol, sec-butanol ve tert-butanolun mikrospor embriyogenesi üzerindeki etkisi 2 yazlık buğday çeşidi (“Pavon” ve “Caramba”) kullanılarak değerlendirilmiştir. Mikrospor gelişim safhası DAPI (40,60-diamidino-2-phenylindole) boyası ile belirlenmiştir. Orta-son tek çekirdekli safhada bulunan mikrosporları içeren anterler 5 gün 127.5 g/l mannitol, 5.9 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve FHG ortamının makrotuzları (8 g/l agaroz ile katılaştırılmış) içerisinde bekletilmiştir. Embriyolar 28 gün sonra J25-8 ortamına regenerasyon için transfer edilmiştir. Embriyolar karanlıkta 25°C de 2 gün tutulmuş ve daha sonra ışıklı ortama alınmıştır. N-butanol’un başlangıç ortamına % 0.1 ve 0.2’lik 5 saatlik uygulamaları, embriyo üretimini her iki çeşitte de önemli derecede arttırmıştır. Sec- ve tert-butanol uygulamaları kontrol bitkileri ile aynı performansı göstermiştir. Regenerasyon yeteneği herhangi bir butil-alkol uygulamasında değişiklik göstermemiştir. Ploidi seviyesi, bitkiler toprağa transfer edildikten sonra flow sitometri yöntemi ile belirlenmiştir. N-butanol uygulamasından sonra yüksek embriyo üretimi olduğu gibi, yeşil regenere bitki sayısı “Pavon” çeşidinde 5 ve “Caramba” çeşidinde 3 kat artmıştır. Yeşil bitki oranı uygulamayla gelişmiş ya da etkilenmemiştir. DH bitki üretimi n-butanol uygulamasından sonra kontrol bitkilerine göre 2-4 kat artmıştır. Bu yüzden, n-butanol buğday DH lerin üretiminde başarılı biçimde uygulanmıştır. Bu alkolün fosfolipaz D’nin aktivatörü olduğu bilinmektedir ve ilk olarak korteks mikrotubullerini parçaladığı ve onları bitkilerdeki plazma membranından ayırdığı belirtilmiştir. Androgenik oluşuma etkileri ise, bitki hücresindeki mikrotubullerin düzenlenmesinin önemini desteklemesi, özellikle mikrospor gelişimindeki fosfolipaz D’nin muhtemel katılımı tartışılmıştır.

Chauhan ve Khurana (2010) ekmeklik buğdayda *Agrobacterium* aracılığı ile genetik transformasyon için anter kültürü ile elde edilen embriyoları eksplant olarak kullanmışlardır. Kuraklık toleransı için arpa HVA1 geni kullanılmıştır. Regenere bitkilerin T(0) generasyonunda transgen integrasyonu kontrol edilmiş ve pozitif transgenik haploid bitkiler kolşisin uygulaması ile doubled haploidlere dönüştürülmüştür. Stabil transgenik doubled haploid bitkiler elde edilmiş ve transgen ekspresyonu (ifadesi) T(4) generasyonuna kadar gözlenmiştir ve generasyon boyunca

transgen susturması gözlenmemiştir. Doubled haploid transgenik bitkiler transgenik olmayan doubled haploidlerle karşılaştırıldığında daha hızlı tohum çimlenmesi ve fide oluşumu ayrıca daha iyi kuraklık toleransı göstermiştir. Çimlenme yüzdesi, fide büyümesi ve biomas birikimi ölçümleri yapılmıştır. Abiyotik stres için fizyolojik değerlendirme nitrat redüktaz enzim aktivitesi ve bitki verimi ile belirlenmiştir. Çiçeklenme sonrası su kısıtlanması transgenik bitkilerde yabancı tiplere göre daha iyi tolerans göstermiştir. Bu çalışma anter kültür tekniği ile doubled haploid transgenik buğday üretiminin yapıldığı ilk çalışmadır. Bu metot ayrıca buğdayın ve tarımsal önemi olan diğer allopoliploidlerin işlevsel genomisinde yararlı olabilir.

Redha ve Suleman (2010) buğday genotiplerinin androgenesis yeteneğini anter ve embriyo benzeri yapıları poliaminler ile ön işleme alarak değerlendirmişlerdir. Doubled haploid genotip anterlerine çeşitli konsantrasyonlardaki putresin, spermidin ve spermin ile 1, 3 ve 6 saat süre ile ön işlem yapılmıştır ve kuraklığa toleranslı ICARDA (Uluslararası Kurak Alanlar Tarımsal Araştırma Merkezi) buğday hatları bunlarla 1 ve 3 saat muamele edilmiştir. Ayrıca iki genotipin embriyo-benzeri yapıları aynı poliaminlere 30 ve 60 dakika süre ile maruz bırakılmış ve yeşil bitki regenerasyonları değerlendirilmiştir. Anterlerin poliaminlerle ön işlemi bütün genotiplerde embriyo-benzeri yapı gelişimini arttırmıştır. Embriyo-benzeri yapı oluşumu genotiplerde önemli derecede farklılık göstermiştir. Ön işlem yapılan anterler, 4 uygulamanın da “ICR 17” çeşidinde yeşil bitki regenerasyonunu önemli derecede iyileştirdiğini göstermiştir. Bununla beraber iki uygulama (1 mM putressin ve spermin, 1 saat) sadece 2 ICARDA çeşidinde 100 embriyo-benzeri yapı başına yeşil bitki regenerasyonunu önemli ölçüde iyileştirmiştir. Poliaminlere 30 dakika boyunca maruz bırakılan embriyo benzeri yapılar yeşillenmiş ve çok sayıda ek kök oluşturmuştur. Bu yeşillenmiş embriyo benzeri yapıların kloroplastları bir transmisyon elektron mikroskobu ile incelenmiş ve agranal ve granal tilakoidlere sahip olduğu bulunmuştur. Kontrol grubunda ise plastidlerin çoğunlukla nişasta globüllerine sahip olduğu bulunmuştur. Anterlerin poliaminlere maruz bırakılması ile embriyo-benzeri yapılar ve yeşil bitki üretimi iyileştirilmiş; putressin, spermidin ve spermin etkilerinin genotiplere ve anterlere uygulanan ön işlem süresine bağlı olduğu bulunmuştur.

Islam (2010), kolşisinin bir alkaloid ve mikrotubul depolimerizasyon ajanı olduğunu, metafaz safhasında hücre bölünmesi esnasında mikrotubul oluşumunu inhibe ettiğini ve anafazi engellediğini böylece hücre bölünmesinden önce azalmamış bir kromozom sayısına sebep olduğunu belirtmişlerdir. Genetik çalışmalar ve bitki ıslah programlarında kolşisin kullanımının temel avantajının fertil bitkilerin anter ve mikrospor kültüründe hızlı üretimi olduğunu rapor etmişlerdir. Bu yüzden, çalışmalarında buğday izole mikrospor kültüründe kolşisinin fertil bitkilerin cevabı üzerine olan etkisini araştırmışlardır. Bu durumda kolşisin anterlere ve aynı zamanda izole mikrospora doğrudan maruz bırakılmış ve birbirleriyle karşılaştırılmıştır. İlk deneyde 100 mg/l kolşisin 3 farklı temel ortama eklenmiş ve tüm olgularda kontrolle karşılaştırıldığında (kolşisinsiz) daha çok ya da daha az fertil bitki üretimi meydana geldiği bulunmuştur. Anter kültür ortamına kolşisin uygulanması ile embriyo oluşumu ve yeşil bitki regenerasyonu önemli derecede artış göstermiştir. Kolşisinin izole mikrospor kültüründe doğrudan uygulanması embriyoid oluşumunu 3-4 kat azaltmıştır fakat fertil bitki regenerasyonunu iyileştirmiştir. Kolşisinin anter ve mikrospor kültüründe kullanımı kontrol (kolşisin eklenmemiş) (% 55.26) ile karşılaştırıldığında ortalama kromozom katlanma sıklığını (% 84.94) arttırmıştır. İkinci deneyde, farklı konsantrasyonlardaki kolşisin (50, 100, 150 mg/l, 3 gün boyunca) AMC ortamına eklenmiş ve bu durum embriyo ve regenere yeşil bitki sayısını azaltırken albino bitki regenerasyonunu arttırmıştır. Kolşisin konsantrasyonu arttıkça embriyo sayısı önemli derecede azalmıştır fakat bu çalışmanın ana amacı olan katlanma indeksi artmıştır. Bu durumda diploid bitkilerin ortalama sıklığı (% 81.73) üç uygulamada da kontrol ile karşılaştırıldığında (% 72.40) artış göstermiştir. Bu bulgular kolşisin uygulamasının yararları hakkındaki bilgileri arttırmış ve buğday mikrospor kültüründe doubled haploid üretiminin arttırılmasında izole mikrospor kültürü için en uygun kolşisin konsantrasyonunu ortaya çıkarmıştır.

Htwe vd. (2011) doku kültür tekniğinin *in vitro* kültür sürecinde genetik modifikasyon yoluyla genetik değişiklik için bir kaynak olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Bu teknik genel olarak ıslah amaçlı, özellikle pirinç üretimini önemli derecede sınırlayan stres toleransı seçiminde kullanılmaktadır. Ayrıca elverişli bir bitki regenerasyon sisteminin kurulması başarılı genetik transformasyon için bir ön koşuldur. Araştırmacılar bu çalışmalarında bazı Malezya pirinç genotiplerinin *in*

vitro tuz stresine cevabını değerlendirmeyi ve en uygun ortamı belirlemeyi amaçlamışlardır. Kültür koşullarındaki farklılıklar olarak büyüme oranı, bitki hormon cevabı ve prolin birikimi gözlenmiştir. Bütün genotiplerin kallus büyüme kapasiteleri genotipler ve kültür ortamı tarafından önemli derecede etkilenmiştir. Kallus 10 µM 2,4-D ve 0.4 g/ml kazein hidrolizat eklenmiş MS ortamında en iyi gelişimi göstermiştir. Ek olarak, kallustan gövde regenerasyon kapasitesi 10µM BAP eklenmiş ½ MS ortamında en etkili durumda olmuştur. MR219 (hat 4) ve MR219 (hat 9) sürekli olarak hem kallus kültüründe (% 93.51 ve 92.22) hem de bitki regenerasyon kapasitesi (% 27.03 ve 26.34) bakımından en iyi sonuçları vermiştir. Kalluslar tuzluluğa cevaplarını incelemek amacıyla farklı konsantrasyonlarda NaCl (0 ve 250 mM) ortamlarına aktarılmıştır. “MR219” (hat 4) ve “MR219” (hat 9) çeşitlerinde kallus büyümesinde (% 18.83 ve 23.5) ve regenerasyon kapasitesinde (% 7.33 ve 7.68) önemli derecede düşüş görülmüştür. Benzer sonuçlar prolin içeriğinde de gözlenmiştir. Bütün genotiplerde anlamlı bir prolin birikimi görülmüştür. “MR211” en yüksek birikimi gösterirken “MR219” (hat 4) genotipinde bu oran en düşük miktardadır.

2.2. Prolin ve Kalsiyum ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Santos vd. (1996) yaptıkları çalışmada dışarıdan uygulanan prolin (6 mM) ve artan NaCl dozlarının (0.4 -1.2 % w/v) tuza duyarlı doğal mısır “W64AO2” den elde edilen organogenik ve embriyogenik kallus hatlarının korunması üzerine etkisini araştırmışlardır. Bu amaçla, toplam protein, serbest amino asit ve poliamin içeriği analiz edilmiştir. Dışarıdan verilen azot ve prolin, tuz varlığında bile, iki tip morfogenik kallus oluşmasına sebep olmuşlardır. Çalışılan bütün uygulamalarda embriyogenik kallusların toplam protein içeriği prolin varlığında daha yüksek olmuştur. Organogenik kalluslarda prolinin olumsuz bir etkisi gözlenmiştir: Prolin ve tuz varlığı protein içeriğini önemli ölçüde düşürmüştür. Amino asit ve poliamin içeriği ile ilgili olarak, organogenik kalluslar tuza adaptasyonda fizyolojik özellikler geliştirirken embriyogenik kallusların NaCl’ye daha duyarlı oldukları görülmüştür. Tuz varlığında içsel prolin kültüre alınan organogenik kalluslarda artsa da, embriyogenik kalluslarda sadece düşük tuz konsantrasyonlarında artış meydana

gelmiştir. Bununla beraber, tuz koşulları altında içsel arginin içeriği organogenik kalluslarda daha yüksektir. Prolin ve poliamin metabolizmaları arasındaki dengeleyici bir etkinin tuz stresine cevapta içsel arjinin içeriği ile ilgili olduğu ayrıca gözlenmiştir. Bu etki iki tip kallus oluşmasına sebep olmuştur.

Tantau vd. (2004) yaptıkları çalışmada iki sıralı kışlık arpa çeşidi “İgri” anter kültüründen elde ettikleri embriyogenik kallusları, prolin analogu hidroksiprolin (Hyp) ($10-20 \text{ mmol l}^{-1}$) içeren L3 ortamında kültüre almışlardır. Hyp’ye maruz bırakılan kallusların çoğunluğunda şiddetli ölçüde dejenerasyon meydana gelmiştir. Hyp’ye dirençli kalluslar, açık renkleri, yüksek büyüme oranları ve Hyp’ye maruz bırakılmayan sadece L3 regenerasyon ortamına alınan kontrol kalluslar göz önüne alınarak ayırt edilmişlerdir. Hyp 46’ya maruz bırakılan 22.500 anterden Hyp’ye dirençli regenerantlar elde edilmiş ve toprağa aktarılmıştır. Normal büyüme koşullarında 5-10 haftalık bir yetiştirme periyodu sonrasında, kontrol regenerantlar ile birlikte 2°C kısa gün koşulları altında sertleştirilmiş soğuğa maruz bırakılmışlardır. Soğuğa tolerans soğuğa maruz bırakılan ve bırakılmayan tamamen büyüyen yaprakların segmentlerinin elektriksel iletkenliği ölçülerek değerlendirilmiştir. Bunun sonucunda Hyp’ye dirençli regenerantların kontrol regenerantlardan soğuğa önemli derecede fazla toleranslı olduğu ortaya konmuştur. İyileştirilmiş soğuk toleransı ayrıca R1 ve R9’da bulunmuştur ve R1 generasyonunun genotipik dağılımının 1:2:1 oranında olduğu gösterilmiştir. R2 generasyonunda ve sonraki generasyonlarda prolin içeriğinin arttığı gözlenmiştir. Bu artış, Hyp hatlarında artan soğuk toleransı ile önemli derecede ($P \leq 0.001$) korelasyon göstermiştir. Karşılaştırmalı çalışmalar, Hyp hatlarında, çaprazlama deneylerinin soğuğa toleransı kalıtsal olarak iyileştirdiğini doğrulamıştır. Sonuçlar soğukta yetiştirilen kışlık arpa bitkilerinde prolin birikimi hipotezini desteklemektedir. Bunun yanında tarif edilen biyoteknolojik prosedürün, kışa dayanıklılığın ve diğer stres toleranslarının iyileştirilmesi için ıslah programlarında uygulanabilir olduğunu da belirtmişlerdir.

Jaleel vd. (2008), yaptıkları çalışmada NaCl faktörü üzerine CaCl_2 ’nin iyileştirici etkisini *Phyllanthus amarus* bitkisinin tohumlarını kullanarak araştırmışlardır.

Tohumlar % 0.2'lik (w/w) HgCl₂ solüsyonunda 5 dakika boyunca çalkalanarak steril edilmiş ve daha sonra deiyonize su ile yıkanmıştır. Tohumlar plastik saksılara (300 mm) ekilmiştir. Her saksıya 10 tane tohum ekilmiştir. Ekimden sonraki 20 gün saksılar yer altı suyu ile (kontrol), 80 mM NaCl, 80 mM NaCl + 5 mM CaCl₂ ve 5 mM CaCl₂ solüsyonu ile sulanmıştır. Bitkiler ekimden 30, 40 ve 50 gün sonra rastgele toplanmış ve biyokimyasal belirteçleri ve antioksidant enzim aktivitesini ölçmek için kullanılmıştır. NaCl *P. amarus* bitkilerinin kök, yaprak ve gövdelerinde protein içeriğini azaltmıştır. NaCl uygulamasına CaCl₂ eklenmesi ile protein içeriği NaCl stresinde olan bitkilerle karşılaştırıldığında artış göstermiştir. NaCl ve CaCl₂ uygulamaları kontrolle karşılaştırıldığında bitkilerin tüm parçalarındaki serbest amino asit ve protein içeriğini arttırdığı görülmüştür. NaCl stresindeki bitkilerde CaCl₂ uygulaması ile serbest amino asit ve protein içeriği azalmıştır. CaCl₂ + NaCl uygulamasında bitkilerde toplam şeker içeriği NaCl stresinde olan bitkilere göre daha yüksek olmuştur. NaCl uygulaması protein ve şeker içeriğini düşürmüş, serbest amino asit ve prolin içeriğini arttırmıştır. CaCl₂ uygulaması serbest amino asit dışında incelenen tüm maddeleri iyileştirmiştir. NaCl ve CaCl₂ uygulanan bitkilerde kontrolle karşılaştırıldığında peroksidaz aktivitesinin arttığı görülmüştür. CaCl₂ + NaCl uygulaması stres altındaki bitkilerde preoksidaz aktivitesini düşürmüştür.

Jafari vd. (2009) tuzluluk, kalsiyum ve potasyumun sera koşullarında bulunan darı (*Sorghum bicolor* L.) bitkilerinin fizyomorfolojik özellikleri üzerine karşılıklı etkilerini araştırmışlardır. Her kutuya altmış tohum konmuş ve fideler eşit mesafede tutulmuştur. Denemeler 4 NaCl konsantrasyonu (0, 80, 160 ve 240 mM NaCl), 2 CaCl₂ konsantrasyonu (0 ve 20 mM) ve 2 KCl konsantrasyonu (0 ve 20 mM) kullanılarak yapılmıştır. Tuzluluk bitki büyümesini büyük ölçüde azaltmıştır. Bu bitki boyu, gövde ve kök ağırlığında azalmalar ile ölüm oranı ve üreme aşamasında gecikmeler şeklinde yansımaktadır. Fakat kısmi su içeriği, CO₂ asimilasyon oranı ve terleme oranı sadece şiddetli tuzlulukta olumsuz etkilenmiştir. Kök/gövde ağırlığı ve yaprak/toplam bitki ağırlığı oranları tuzluluk koşullarında artmıştır, bunlar tuzluluk varlığında darı bitkilerinin toleransını arttırmıştır. Ek kalsiyum uygulaması bitki büyümesi üzerine yüksek tuzluluğun olumsuz etkilerini kısmen azaltmıştır. Aksine ek potasyum uygulaması ile bitki büyüme karakteristikleri arasında olumsuz bir

etkileşimin olduğu görülmüştür. Ca^{+2} ve K^{+} 'nın birlikte uygulanmasının tuzluluk stresi altında darı bitkilerinin büyüme ve morfolojik özellikleri üzerine iyileştirici bir etkisi olduğu görülmüştür.

Redha ve Islam (2009) tek başına veya kolşisin ya da prolin ile dehidrasyonun yazlık buğday çeşidi “DH83Z118.32” anter ve izole mikrospor kültürü üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Dehidrasyon anter ve izole mikrospor kültürlerinde embriyogenesis ve bitki regenerasyonunu iyileştirmiştir. Anter kültüründe tek başına kolşisin uygulaması embriyogenesisi azaltmış ve bitki regenerasyonunu arttırmıştır. Dehidrasyon-kolşisin kombinasyonu, anter kültüründe embriyogenesis ve bitki regenerasyonunu önemli derecede inhibe etmiştir. L-Prolin uygulaması bitki regenerasyonunu % 7.5 oranında arttırmış; bununla beraber dehidrasyonla kombinasyonu durumunda hem embriyogenesisi hem de bitki regenerasyonunu önemli derecede iyileştirmiştir. Bir saat dehidrasyon ve 100 mg l^{-1} prolin kombinasyonunda embriyo ve bitki üretimi % 83.1 ve % 16.5 oranlarında önemli ölçüde iyileşmiştir. Prolin-dehidrasyon uygulaması embriyogenesis ve bitki regenerasyonunu, fizyolojik hücre turgoru ve/veya kültürü yapılan gametofitik hücrelerin membran bütünlüğünü koruyarak arttırabildiği sonucuna varılmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışma, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde bulunan "Bitki Doku Kültürü ve Biyodozimetri Laboratuvarı'nda 2009-2011 yılları arasında yürütülmüştür. Denemelerde materyal olarak *Triticum durum* Desf. cvs. "Kundurü 1149", "Kızıltan 91", "Mirzabey 2000" ve "Ç-1252" makarnalık buğday çeşitleri ($2n=4x=28$, AABB) kullanılmıştır. Çeşit tohumları, Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsünden temin edilmiştir (Şekil 3.1.). "Kundurü 1149", 1967'de Eskişehir Tohum Islah İstasyonu'na tescil ettirilmiştir. Kışa ve kurağa dayanıklılığı iyi, yatmaya dayanıklılığı orta, orta erkenci, alternatif bir çeşittir. Tanesi çok sert ve beyazdır. Orta Anadolu ve Geçit Bölgelerinin sulanmayan alanlarına önerilmektedir. Ortalama verim 300 kg/da'dır. "Kızıltan 91", 1987'de Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü tarafından tescil ettirilmiş, kılçıklı ve kahverengi kavuzlu, orta boylu ve sağlam saplı bir çeşittir. Ayrıca kurağa dayanıklılığı en iyi, kışa ve soğuğa dayanıklılığı iyidir. Türkiye makarnalık buğday ekim alanlarının % 26'sını kaplamaktadır. İç Anadolu ve Geçit Bölgelerinin taban-yarı taban alanlarında önerilmektedir. Ortalama verim 300 kg/da'dır. "Mirzabey 2000", kahverengi kavuzlu ve beyaz kılçıklı, orta boylu, sağlam saplı bir çeşittir ve soğuğa, kışa ve kurağa dayanıklılığı iyidir. Verim potansiyeli 210-350 kg/da'dır. İç Anadolu ve Geçit bölgeleri ile Batı geçitte Afyon, Uşak, Kütahya yörelerinde kurağın, soğğun kısıtlayıcı faktör olduğu yerlerin yarı taban ve taban alanlarına önerilmektedir. "Ç-1252" ise kılçıklı ve kahverengi kavuzlu, soğuğa ve kışa dayanıklılığı iyi bir çeşittir. Türkiye makarnalık buğday ekim alanlarının % 24'ünü oluşturmaktadır ve ortalama verim 400 kg/da'dır. Ege ve Akdeniz geçit bölgelerinde ve Güneydoğu Anadolu Bölgesinde de yetiştirilmektedir (TAGEM, 2008).



Şekil 3.1. Makarnalık buğday çeşitlerine ait tohumlar

3.2. Yöntem

3.2.1. Donör (verici) bitkilerin yetiştirilmesi ve başakların toplanması

Bir kısım kum ve 3 kısım turba toprak karışımı saksılara konularak yüzey düzleştirildi. “Kunduru 1149”, “Kızıltan 91”, “Mirzabey 2000” ve “Ç-1252” çeşitlerine ait tohumlar her saksıya 3 adet olacak şekilde ekildi. Çalışmada ortalama 70 adet saksı kullanıldı. Tohumların ekiminden itibaren bitkiler, 16 saat/gündüz 8 saat/gece fotoperiyodu düzeninde, 12 kilolüks ışık yoğunluğu, 18-20 C° sıcaklık ve % 51-54 nem oranı (PeakTech 3695 ile ölçüldü) koşulları altında ortalama 3-4 ay boyunca bitki büyüme kabininde yetiştirildi (Şekil 3.2. a-b). Güçsüz olan bitkiler saksılardan alındı. Denemede yetiştirilen donör bitkilere gerekli durumlarda ortalama 30 günde bir suni gübre (N : P : K) verildi ve ayrıca hastalıklara karşı ilaçlama yapıldı. Henüz olgunlaşmamış ve içerisinde birinci polen mitozu aşamasına gelmiş tek çekirdekli mikrosporları bulunduran anterler, anter kültürü için uygun başlangıç materyali olduğundan başaklar, bu durum esas alınarak toplandı (Şekil 3.2. c).



(a)



(b)

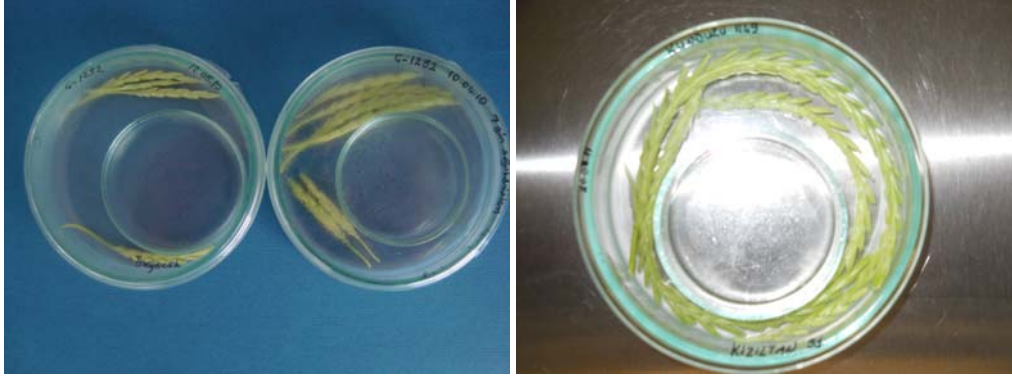


(c)

Şekil 3.2. Donör bitkilerin yetiştirilmesi ve toplanması, (a-b) Donör makarnalık buğday bitkileri, (c) Yaprak kınından henüz çıkmamış, bayrak yaprağı görünme safhasında olan anter kültürü için uygun başak

3.2.2. Soğuk ön işlem

Triticum durum Desf. cvs. “Kunduru 1149”, “Kızıltan 91”, “Mirzabey 2000” ve “Ç 1252” makarnalık buğday çeşitlerine ait bayrak yaprağı görünme safhasında olan ve henüz kınından çıkmayan başaklar 0 gün (soğuk ön işlemsiz) ve 7 gün +4°C’de buzdolabında soğuk ön işleme alındı. Çünkü düşük sıcaklıklarda; birinci polen mitozu aşamasında tutulan mikrospor sayısında artış olduğu ve nişasta üretiminin bloke edildiği bilinmektedir. Yani stres önışlemi, anterlerin gametofitik yerine sporofitik yönde gelişimini sağlamaktadır. Başakların steril hava kabininde (laminar flow bench) % 70’lik alkol ile yüzey sterilizasyonları yapıldı ve 3 kez saf su ile durulandı. Steril koşullarda kın yapraklarının içinden çıkarılan ve kılçıkları kesilen başaklar, içinde bir miktar steril dH₂O bulunan 3 cm’lik petri kutuları ile beraber 9 cm’lik petri kutuları içerisine yerleştirildi (Şekil 3.3.). Petri kutularının kenarları parafilm ile kapatıldı, alüminyum folyo ile sarıldı ve üzerlerine çeşit, başak sayısı ve günün tarihi yazıldı. Bu şekilde +4°C’de saklanan başaklar soğuk ön işlem süreleri tamamlandıktan sonra çıkarılarak kültür ortamına konulmak üzere steril ortama alındı.



Şekil 3.3. Soğuk ön işleme alınmak üzere kılçıkları kesilmiş ve 9 cm’lik petri kaplarına konulmuş başaklar

3.2.3. Kültür ortamlarının hazırlanışı

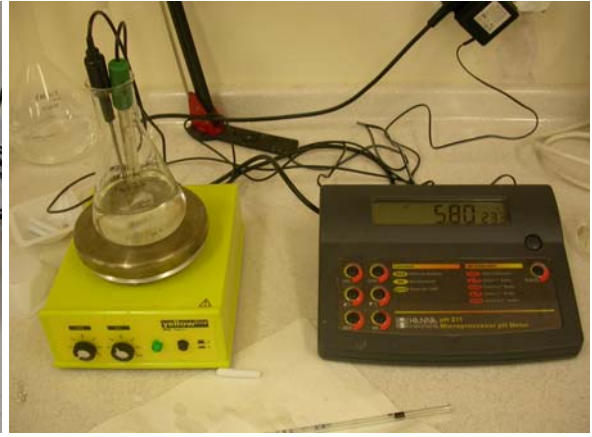
Kültür için Wang ve Hu (1984) tarafından geliştirilen 190-2 ile Wang ve Chen (1986) tarafından geliştirilen C17 başlangıç ortamları ve modifiye MMS3 regenerasyon ortamı (Hu and Kasha, 1997) kullanıldı (Çizelge 3.1.). Kültür ortamında kullanılan kimyasal maddeler hassas terazide ölçülerek ağırlık/hacim (w/v) esasına göre ve 190-2 ve C17 sıvı kültür ortamları her defasında 100 ml olacak şekilde hazırlandı. Öncelikle fikal 50 ml dH_2O ile birlikte bir erlen mayer kabına konuldu, kabın ağzı pamuk ile kapatıldı ve mikrodalga fırında eritildikten sonra (Şekil 3.4.a) 121°C 'de, 1 atm basınçta, 20 dakika süre ile otoklavda sterilize edildi. Diğer 50 ml’lik dH_2O 'da ise makrotuzlar, mikrotuzlar, vitaminler, şekerler ve diğer komponentler hazırlanacak olan sıvı ortam protokolüne uygun miktarlarda alınarak fikal’den ayrı olarak eritildi (Şekil 3.4.b). Ayrıca 100 mg NAA, 70-80 ml % 96’lık etil alkol içerisinde, aynı şekilde 100 mg Kinetin 70-80 ml 0.3 N’lik HCl içerisinde eritildikten sonra hacim distile su ile 100 ml olacak şekilde tamamlandı (Babaoğlu vd., 2002). Böylece son hacimde 1.0 mg/ml’lik NAA ve Kinetin stok solüsyonları hazırlandı. Bu stok solüsyonlardan 0.2 ml/100ml NAA ve 0.15 ml/100 ml Kinetin alınarak ortam içeriğine eklendi. Ortamın pH’ı 1N NaOH, 0.1 N NaOH, 1 M HCl ve 0.1 M HCl yardımı ile 5.8’e ayarlandı (Şekil 3.4.c).



(a)



(b)



(c)

Şekil 3.4. Kültür ortamlarının hazırlanması,
(a) Fikolun mikrodalga fırında eritilmesi, (b) 190-2 ve C17 sıvı kültür ortamı bileşenleri, (c) Kültür ortamı pH'sinin ayarlanması

Daha sonra tüm ortam içeriği steril kabinde milipor sterifil (0.22 μ m) kullanılarak filtre edildi (Şekil 3.5.a). Son olarak otoklavdan alınan ve soğutulan fikol bu ortama eklendi ve 100 ml'lik sıvı kültür ortamı hazırlandı.

MMS3 regenerasyon ortamı ise daha önceden hazırlanan stok makrotuz (x10), mikrotuz (x100), vitamin (x100), diğer komponentler ve agar (Çizelge 3.1.) kullanılarak hazırlandı ve otoklavda 121°C'de, 1 atm basınçta steril edildi. Ayrıca çeşitlerin bitki regenerasyonu üzerine olan etkisini belirlemek amacı ile NaCl (0.5, 1.0 ve 1.5 mM), prolin (2 mg/l) ve CaCO₃ (1 mM) kültür ortamına eklendi (Şekil 3.5.b). MMS3 ortamı çeşitli kombinasyonlarda aşağıdaki şekilde hazırlandı;

1. MMS3 (Kontrol)
2. MMS3 + 0.5 mM NaCl
3. MMS3 + 1 mM NaCl
4. MMS3 + 1.5 mM NaCl
5. MMS3 + 0.5 mM NaCl + CaCO₃ (1 mM)
6. MMS3 + 1 mM NaCl + CaCO₃ (1 mM)
7. MMS3 + 1.5 mM NaCl + CaCO₃ (1 mM)
8. MMS3 + 0.5 mM NaCl +Prolin (2 mg/l)
9. MMS3 + 1 mM NaCl +Prolin (2 mg/l)
10. MMS3 + 1.5 mM NaCl +Prolin (2 mg/l)



(a)



(b)

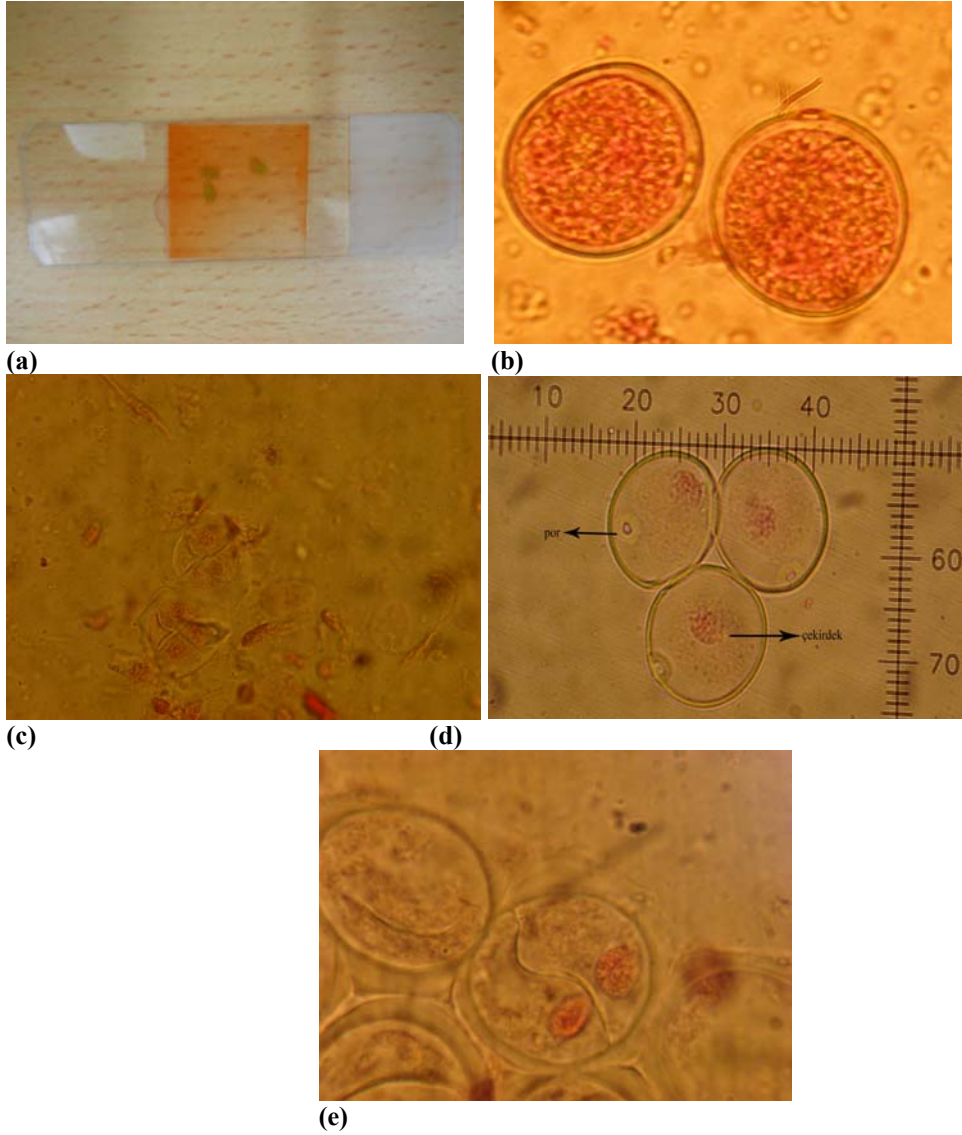
Şekil 3.5. Kültür ortamlarının hazırlanması,
(a) Sıvı ortamın milipor sterifilde filtre edilmesi ve sterilizasyonu,
(b) Çeşitli kombinasyonlarda hazırlanan MMS3 regenerasyon ortamları

Çizelge 3.1. 190-2 ve C17 başlangıç ile MMS3 regenerasyon ortamı bileşenleri

Ortam Kompozisyonu	190-2 başlangıç kültür ortamı (mg/l)	C17 başlangıç kültür ortamı (mg/l)	MMS3 regenerasyon ortamı (mg/l)
Makrotuzlar			
1.KNO ₃	1.000	1.400	1.400
2.(NH ₄) ₂ SO ₄	200	-	-
3.MgSO ₄ .7 H ₂ O	200	150	370
4.KH ₂ PO ₄	300	400	170
5.Ca(NO ₃) ₂ x 4H ₂ O	100	-	-
6.KCl	40	-	-
7.CaCl ₂ .2H ₂ O	-	150	440
8.NH ₄ NO ₃	-	300	300
Mikrotuzlar			
1.MnSO ₄ x H ₂ O	8	-	-
2.MnSO ₄ x 4H ₂ O	-	11.2	-
3.MnSO ₄ x 7H ₂ O	-	-	22.3
4.ZnSO ₄ x 7H ₂ O	3	8.6	8.6
5.H ₃ BO ₃	3	6.2	6.2
6.KI	0.5	0.83	0.83
7.CoCl ₂ .6H ₂ O	-	-	0.025
8.CuSO ₄ .5H ₂ O	-	-	0.025
9.Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	-	-	0.25
Demir Kaynağı			
1.Na ₂ EDTA x 2H ₂ O	37.3	37.3	37.3
2.Fe ₂ SO ₄ x 7H ₂ O	27.8	27.8	27.8
Vitaminler			
1.Thiamine HCl	1.0	0.5	0.4
2.Nicotinic Asit	0.5	0.5	0.5
3.Pyridoxine HCl	0.5	-	0.5
4.Biotin	-	1.5	-
Amino asitler			
1.Glisin	2.0	8	-
2.Glutamin	-	-	500
Karbon Kaynağı			
1.Sükroz	90.000	90.000	-
2.Maltoz	-	-	90.000
Myo-İnositol	100	-	100
Bitki Büyüme Regülatörleri			
1.NAA	2.0	2.0	0.5
2.Kinetin	1.5	1.5	0.5
Ajanlar			
1.Fikol	100.000	100.000	-
2.Agar	-	-	7.000
pH	5.8	5.8	5.8

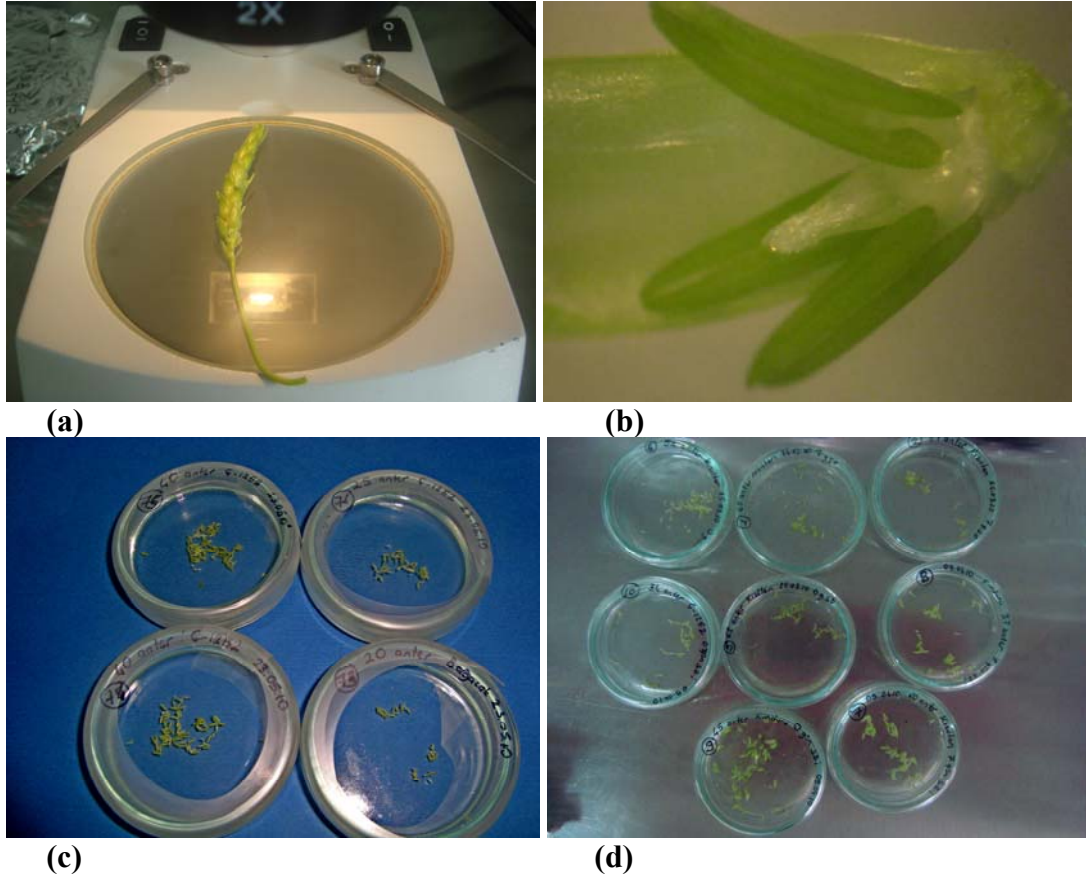
3.2.4. Steril ortamda yapılan işlemler

Anterler kültür ortamına konulmadan önce her başağın ortasından bir anter alındı ve içerisinde bulunan mikrosporların gelişme devresi bir damla % 2'lik asetokarmin boyası ile ışık mikroskobu altında kontrol edildi (Şekil 3.6.a). Kültürde, polen ana hücrelerinin, mayozun Profaz I (Şekil 3.6.b) ve tetrat evresini (Şekil 3.6.c) geçirmiş ve henüz iki hücreli polen halini almamış, orta veya geç tek çekirdekli mikrosporları bulunduran (Şekil 3.6.d) anterler kullanıldı. Böylece iki hücreli geç mikrospora ulaşması engellendi (Şekil 3.6.e).



Şekil 3.6. Gelişen anterde hücresel bağları gösteren diyagramlar, (a) Anterlerin asetokarmin ile hazırlanan ezme preparatı, (b) Profaz I (c) Orta-tek çekirdekli mikrosporlar (x40 büyütme), (d) Tetrat evresi, (e) İki hücreli polen

3 cm'lik petri kutularına konulan anterler, steril ortamda stereo mikroskop kullanılarak, iki steril pinset ile alınarak yerleştirildi (3.7.a-b). Bir ml kültür ortamı için 10-20 anter olmak üzere her petri kabına ortalama 30-60 anter konuldu (Şekil 3.7.c-d). Ayrıca 190-2 ve C17 başlangıç kültür ortamlarına anterlerle birlikte 5-6 adet ovaryum eklendi.

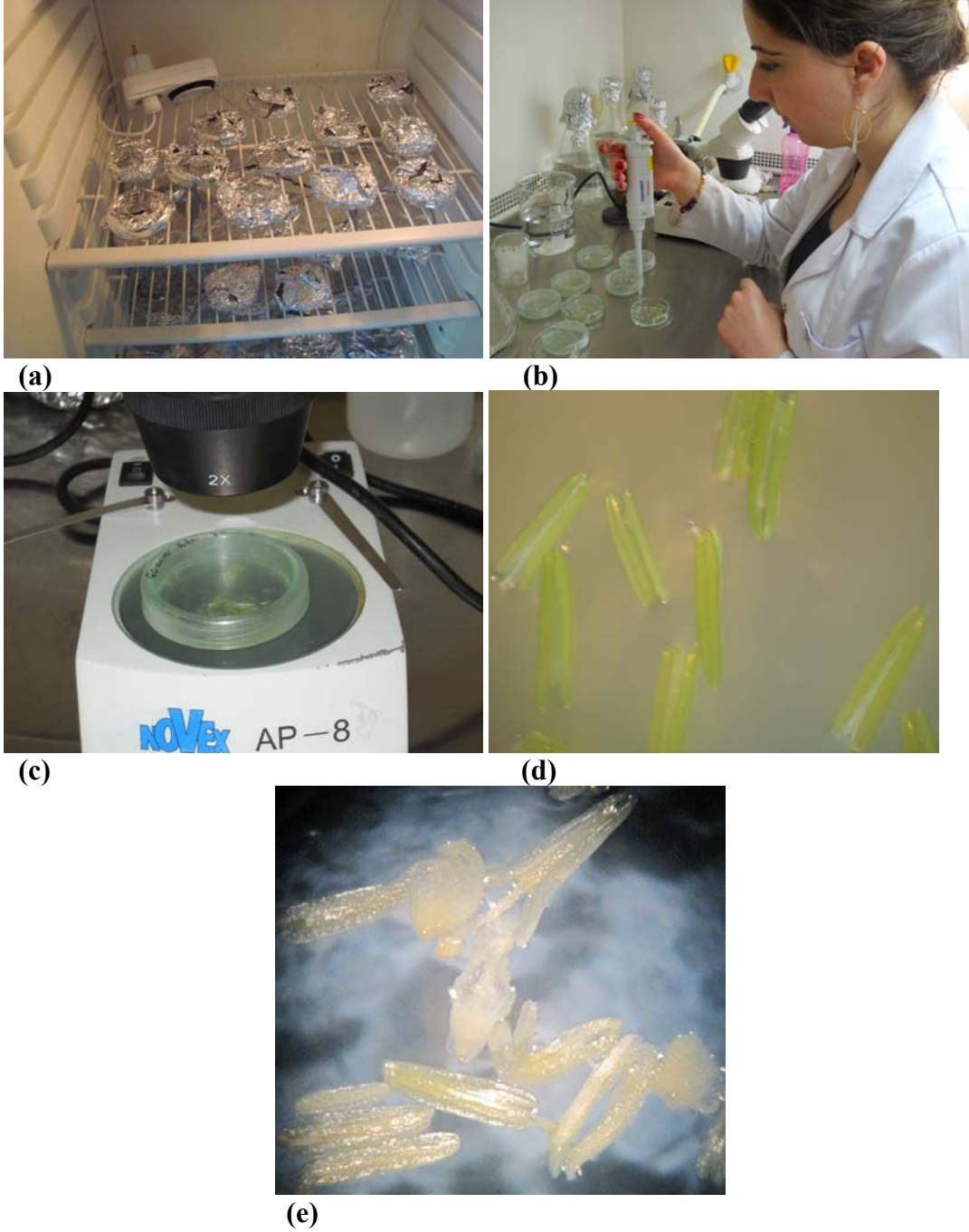


Şekil 3.7. Steril ortamda yapılan işlemler,
(a-b) Stereo mikroskop kullanılarak başaklardan anterlerin alınması,
(c-d) Anterlerin içerisinde sıvı kültür ortamı bulunan 3 cm'lik petri
kutularına konması

Üç cm'lik petri kaplarının kenarları parafilm ile sarılarak alüminyum folyo ile kaplandı ve üzerine çeşit, anter sayısı, tarih yazılarak inkübatöre alındı. Kültürlerin inkübasyonu 28°C' de, ışısız ortamda yapıldı (3.8.a).

Yenileme işlemi (kültür çözeltisi ilavesi); kültür başlangıcının 2. ve 4. haftalarında yine steril ortamda, her petri kabı için ayrı bir mikropipet ucu kullanılarak yapıldı.

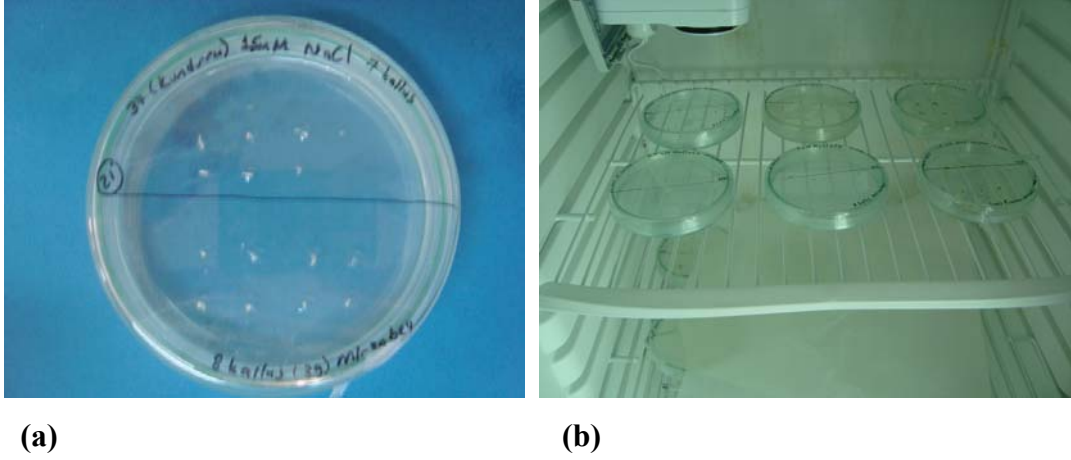
Bunun için her ilk kültür petrisinden 1 ml alınarak yerine 1 ml taze kültür ilave edildi ve yenileme işlemi tamamlandı (3.8.b). İnkübasyon işleminden sonra, kallus üreten ve üretmeyen anterler ve oluşan kallus sayısı her çeşit için ayrı ayrı sayılarak kaydedildi (Şekil 3.8.c-d-e).



Şekil 3.8. Kültürlerin inkübasyonu ve kallus oluşumu,
(a) Kültürlerin 28°C’de ışısız ortamda inkübasyonu, (b) Yenileme işlemi,
(c-d-e) Kallus üretmeyen ve üreten anterler

3.2.5. Regenerasyon işlemi

İnkübasyon işlemi sonunda oluşan ortalama 4 haftalık kalluslar (yaklaşık 2 mm) MMS3 kontrol ve belirli NaCl konsantrasyonları (0.5, 1.0 ve 1.5 mM) ile CaCO₃ (1 mM) ve prolin (2 mg/l) ile modifiye edilmiş MMS3 ortamlarına alındı (Şekil 3.9.a). Kalluslar bu ortamlarda 25°C sıcaklıkta 16 saat gündüz fotoperiyodunda regenere bitki oluşumu için bir inkübatörde bekletildiler (Şekil 3.9.b).



Şekil 3.9. Regenerasyon işlemi,
(a) Kallusların MMS3 regenerasyon ortamına alınması,
(b) Kallusların 25°C ve 16/8 gündüz/gece fotoperiyodunda
regenere bitki üretimi için bekletilmeleri

3.2.6. Verilerin değerlendirilmesi

Denemelerde Tesadüf Parselleri Deneme Deseni kullanılmış olup, denemeler 3 tekerrürlü olarak yapıldı. Tekerrürlerde her genotipin, kültür ortamına konulan anter sayıları kaydedildi, meydana gelen kallus miktarı ve anter cevabı her çeşit için ayrı ayrı sayılmış, elde edilen kallusun anter sayısına oranı ile % değer bulundu. Bunun yanında NaCl, prolin ve kalsiyum ile modifiye edilmiş 9 ayrı regenerasyon ortamına konulan kalluslardan oluşan yeşil ve albino regenerant sayısı yine ayrı ayrı sayıldı ve her 100 kallusun ürettiği yeşil, albino ve toplam regenerant oranı bulundu. Elde edilen verilerin varyans analizleri SPSS 15 istatistik programı yardımı ile GLM (General Linear Model) kullanılarak yapıldı. Genotip, soğuk ön işlem, NaCl, NaCl +

kalsiyum, NaCl + prolin'den alınan verilerin ve NaCl + prolin ve kalsiyumdan alınan verilerin toplu sonuçları bağımsız, cevap veren anter sayısı, kallus oluşum miktarı ve regenere bitki üretimi ise bağımlı etkenler olarak değerlendirildi. Bu uygulamalarda ortalamaların karşılaştırılması ise Duncan (post hoc) çoklu karşılaştırma testi ile yapıldı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

“Kızıltan 91”, “Kunduru 1149”, “Mirzabey 2000” ve “Ç 1252” çeşitlerinden elde edilen verilerin istatistiksel analizleri sonucunda anter cevabı, kallus oluşumu, toplam regenerasyon ve yeşil regenerant oranının genotip tarafından önemli derecede etkilendiği belirlenmiştir. Anter cevabı ve kallus oluşumu ön işlem uygulaması ve ön işlem x genotip interaksyonundan önemli derecede etkilenirken, regenerasyon, yeşil ve albino oranları üzerindeki etkisi önemsiz bulunmuştur. NaCl uygulaması ve ajanlar x NaCl interaksyonu regenerasyon ve yeşil regenerant oranını önemli derecede etkilerken; genotip x NaCl ve genotip x ajanlar x NaCl interaksyonların da bunların yanında albino oranının da 0.01 seviyesinde etkilendiği görülmüştür (Çizelge 4.1.). Çalışmanın sonraki analizleri her genotip ve uygulama için ayrı ayrı yapılmıştır. Varyans analizi ve F değeri için yapılan diğer hesaplamalar EK-2’de verilmiştir.

4.1. Genotip Etkisi

“Kızıltan 91”, “Kunduru 1149”, “Mirzabey 2000” ve “Ç 1252” çeşitlerine ait ortalama 225 başak toplanmıştır. Genotiplerden 190-2 ve C17 başlangıç kültür ortamlarına alınan toplam 3375 anterin % 69.62’si kültüre pozitif cevap vermiş ve % 18.34 oranında kallus oluşturmıştır (Şekil 4.2.a-c); (Çizelge 4.2.). Çalışmada çoğunlukla yeşilimsi kompakt, az miktarda beyaz kompakt (Şekil 4.2.d) ve yine az miktarda beyaz süngerimsi olmak üzere üç tip kallus elde edilmiştir. Kompakt tip kallusların genellikle küçük ve yeşil (Şekil 4.2.e-f), beyaz süngerimsi kallusların ise büyük ve şeffaf olduğu görülmüştür. “Kızıltan 91” çeşidinde kültüre alınan 942 anterden % 19.32, “Kunduru 1149” çeşidinde kültüre alınan 702 anterden % 22.50 (Şekil 4.2.b), “Mirzabey 2000” çeşidinde kültüre alınan 803 anterden % 13.32 ve “Ç 1252” çeşidinde ise kültüre alınan 928 anterden % 18.53 kallus üretimi gözlenmiştir (Çizelge 4.2.). “Kunduru 1149” çeşidi % 75.92 anter cevabı ve % 22.50 kallus oluşumu ile genotipler arasında en iyi sonucu verirken ($P<0.01$) “Mirzabey 2000” en düşük anter cevabı ve kallus oluşumu gösteren çeşit olmuştur. NaCl ve bunun yanında NaCl + kalsiyum ile NaCl + prolin içeren regenerasyon ortamına alınan 619

kallustan % 16.63 yeşil, % 11.95 albino olmak üzere toplamda % 28.59 oranında regenerant elde edilmiştir (Şekil 4.1.).

Regenerasyon ortamlarına aktarılan kallusların bazı bölgelerinin 2-3 hafta içerisinde kahverengileşmeye başladığı gözlenmiştir. Fakat kallusun sağlıklı olarak kalan yeşil bölgeleri büyümeye devam etmiştir. Bu bölgelerden genellikle yaprak çıkışı gözlenmiş, bir kısmında ise zayıf köklere sahip regenerantlar meydana gelmiştir (Şekil 4.9.e-f). Regenerasyon ortamında bulunan tuz, tolerans faktörleri ve MMS3 ortamında bulunan organik ve inorganik maddeler, bu ortamın oldukça kompleks bir hale geldiğini göstermektedir. Kallustan regenerasyon oluşumunun ortam şartlarından oldukça fazla etkilendiği bilinmektedir. Ayrıca kontrol grubu bitkilerinde böyle gelişim aksaklıklarının bulunmaması, oluşan bu durumun NaCl'den kaynaklı olduğunu düşünmemize sebep olmuştur. Bununla beraber çalışmamızda NaCl'nin bu olumsuz etkileri üzerine tolerans faktörlerinin iyileştirici etkisi değerlendirilmiştir. Genotiplerde en yüksek regenerasyonun % 29.67 ile “Kızıltan 91”de olduğu görülmüştür ($P<0.05$). Bunu % 29.11 ile “Kunduru 1149” izlemektedir. En yüksek yeşil regenerant üretimi yine “Kızıltan 91” ve “Kunduru 1149”da sırasıyla % 18.13 ve % 17.72 oranında meydana gelmiştir. En yüksek albino regenerant üretimi “Ç 1252”de % 12.79 iken en düşük albino oranının (%11.39) “Kunduru 1149”da olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.2.).

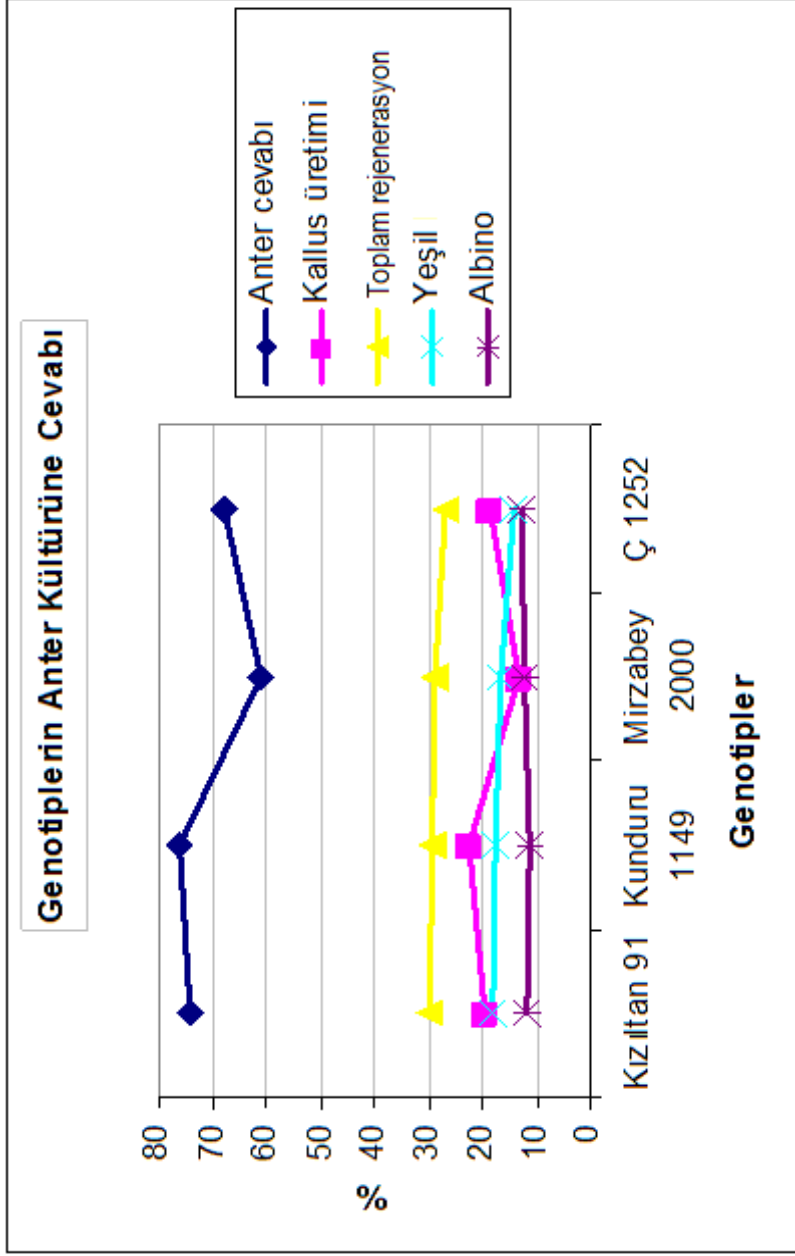
Çizelge 4.1. Deneme verilerinin varyans analiz değerleri

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	F Değeri				
		Anter cevabı (%)	Kallus oluşumu (%)	Regenerasyon (%)		
				Yeşil Regenerant (%)	Albino Regenerant (%)	Toplam (%)
TEKERRÜR	2	0.52 ^{öd}	0.206 ^{öd}	3.056 ^{öd}	3.246 ^{öd}	5.325 ^{öd}
GENOTİP	3	135.355 ^{**}	43.478 ^{**}	10.564 ^{**}	1.231 ^{öd}	4.999 [*]
ÖNİŞLEM	1	36.781 ^{**}	15.574 ^{**}	.500 ^{öd}	3.783 ^{öd}	.212 ^{öd}
ÖN İŞLEM x GENOTİP	3	127.389 ^{**}	70.057 ^{**}	.794 ^{öd}	.281 ^{öd}	.172 ^{öd}

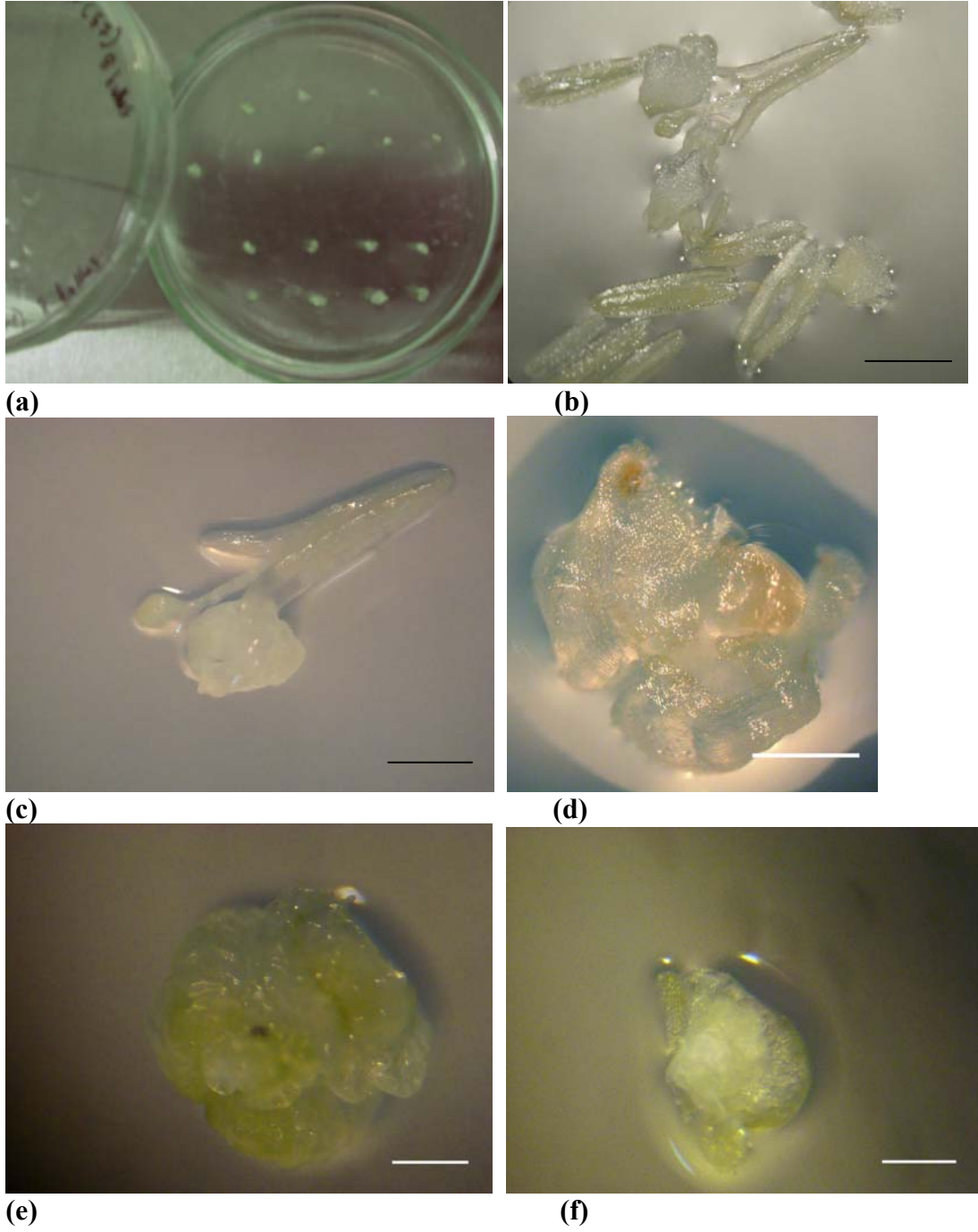
Çizelge 4.1. (devam)

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	F Değeri		
		Regenerasyon (%)		Toplam (%)
		Yeşil Regenerant (%)	Albino Regenerant (%)	
TEKERRÜR	2	0.249 ^{öd}	0.348 ^{öd}	0.42 ^{öd}
NaCl	2	9.996 ^{**}	3.085 ^{öd}	4.101 [*]
GENOTİP x NaCl	6	153.827 ^{**}	245.786 ^{**}	172.681 ^{**}
AJANLAR x NaCl	2	21.264 ^{**}	.040 ^{öd}	20.798 [*]
GENOTİP x AJANLAR x NaCl	6	54.444 ^{**}	13.558 ^{**}	29.081 ^{**}

**0.01, * 0.05, öd önemli değil



Şekil 4.1. Buğday genotiplerinin anter kültürüne cevabı



Şekil 4.2. Buğday genotiplerinden elde edilen kalluslar,
a) Başlangıç sıvı kültür ortamında oluşan ve sonrasında MMS3 regenerasyon ortamına alınan 4 haftalık kalluslar, b) Sıvı kültür ortamında bulunan ve “Kundur 1149” çeşidinden elde edilen kalluslar, c) Anterden karakteristik kallus oluşumu, d) “Ç 1252” çeşidinden elde edilen beyaz kompakt tip kallus, e) “Kundur 1149” çeşidinden elde edilen yeşilimsi kompakt tip kallus, f) “Kızıltan 91” çeşidinden elde edilen yeşilimsi kompakt tip kallus (Bar: 1000 μ m)

4.2. Soğuk Ön işlemin Buğday Genotipleri Üzerindeki Etkisi

7 gün soğuk ön işlem süresinin tüm genotiplerin neredeyse test edilen bütün parametrelerinde ön işlemsiz uygulama ile karşılaştırıldığında daha iyi sonuçlar verdiği gözlenmiştir. “Kızıltan 91” çeşidinde soğuk ön işlemsiz uygulamada anter cevabı % 57.22 iken 7 günlük soğuk ön işlem uygulamasında bu oran önemli derecede artmış ve % 84.53 olmuştur ($P<0.01$) (Çizelge 4.3.). “Kundur 1149”da soğuk ön işlemsiz uygulamada % 13.79 olan kallus üretimi soğuk ön işlemlili uygulamada % 31.07’ye yükselmiştir. Toplam regenerasyon ve yeşil regenerant oranlarının 7 günlük ön işlem uygulamasında daha iyi sonuçlar verdiği gözlenmiştir fakat bu sonuçlar istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (Çizelge 4.3.).

Çizelge 4.2. Buğday genotiplerinin anter kültürüne cevabı

Genotip	Kültüre alınan anter sayısı (n)	Anter cevabı (n)	Anter cevabı** (%)	Kallus üreten anter sayısı (n)	Kallus üretimi** (%)	Regenerasyon***			
						Yeşil		Albino	
						(n)	(%)	(n)	(%)
Kızıltan 91	942	698	74.09 ^a	182	19.32 ^b	33	18.13 ^a	21	11.53 ^a
Kunduru 1149	702	533	75.92 ^a	158	22.50 ^a	28	17.72 ^a	18	11.39 ^a
Mirzabey 2000	803	491	61.14 ^c	107	13.32 ^c	18	16.82 ^a	13	12.14 ^a
Ç 1252	928	628	67.67 ^b	172	18.53 ^b	24	13.95 ^b	22	12.79 ^a
Toplam	3375	2350	69.62	619	18.34	103	16.63	74	11.95
									28.59

* Her sütunda ayrı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir (P<0.01)

** Kullanılan her 100 anter için anter cevabı ve kallus oranı

*** Kullanılan her 100 kallus için regenerasyon oranı

Çizelge 4.3. 0 (kontrol) ve 7 gün soğuk ön işlem uygulamasının genotiplerin anter kültürüne cevabı

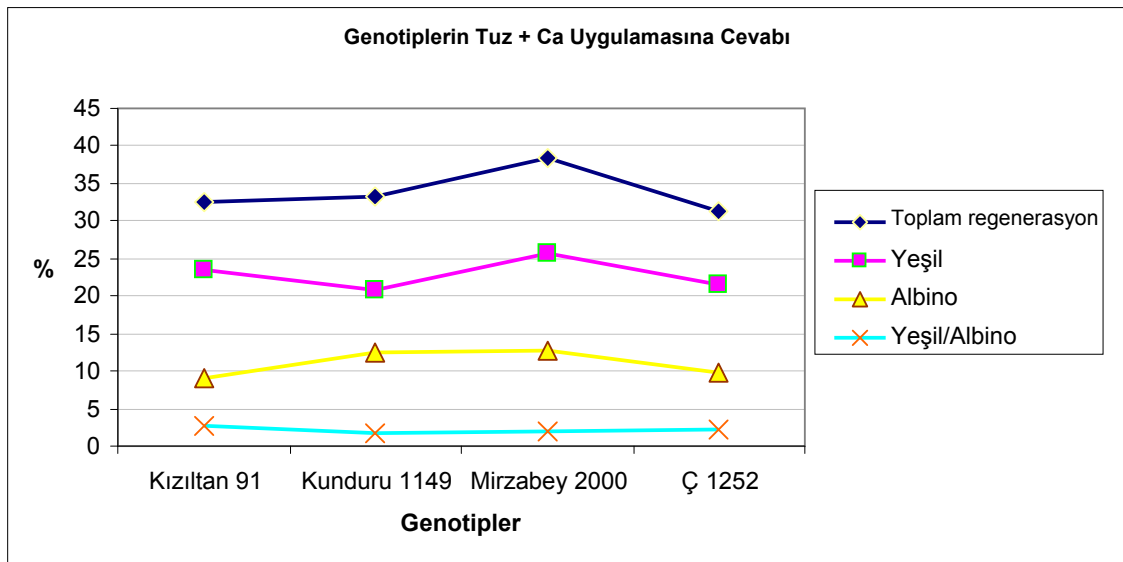
Genotip	Anter cevabı (%)		Kallus üretimi (%)		Regenerasyon (%)		Yeşil (%)		Albino (%)	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Ön işlem**										
Kızıltan 91	57.22 ^b	84.53 ^b	15.00 ^{ab}	21.99 ^b	29.62 ^a	29.68 ^a	17.96 ^a	18.51 ^a	11.71 ^a	11.11 ^a
Kunduru 1149	64.08 ^a	87.57 ^a	13.79 ^{ab}	31.07 ^a	29.16 ^{ab}	29.09 ^a	17.27 ^{ab}	18.75 ^a	11.81 ^a	10.41 ^a
Mirzabey 2000	51.63 ^c	68.02 ^c	12.46 ^b	13.94 ^c	28.57 ^{ab}	29.23 ^a	16.92 ^{ab}	16.66 ^{ab}	12.30 ^a	11.90 ^a
Ç 1252	64.23 ^a	70.57 ^c	16.00 ^a	20.67 ^b	26.47 ^b	26.92 ^a	14.42 ^b	14.70 ^b	12.50 ^a	11.76 ^a
Toplam	57.48	79.00	14.42	21.36	28.30	28.74	16.70	17.15	12.03	11.32

*Her sütunda aynı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir (P<0.01).

** I= 0 gün II= 7 gün

4.3. Buğday Genotiplerinin NaCl+Kalsiyum Uygulamasına Cevabı

NaCl ve Ca ile modifiye edilen regenerasyon ortamına alınan 239 kallustan çeşitli farklılaşma periyotlarından sonra (Şekil 4.4.a-b-c-d) ortalama 4 hafta sonunda % 22.59 yeşil ve % 10.87 albino olmak üzere toplamda % 33.47 oranında regenerant elde edilmiştir (Şekil 4.4.e). “Mirzabey 2000” % 38.46 ile en yüksek değerde regenerant üreten çeşit olurken ($P<0.01$), en düşük regenerasyon % 32.46 ile “Kızıltan 91” çeşidinde meydana gelmiştir (Çizelge 4.4.). “Mirzabey 2000” yeşil regenerant üretiminde de en iyi değeri veren çeşit olmuştur (Şekil 4.3.). Bu çeşidi % 23.37 yeşil regenerant oranı ile “Kızıltan 91” izlemektedir (Şekil 4.4.f). En düşük yeşil regenerant üretimi ise % 20.83 ve % 21.56 ile sırasıyla “Kunduru 1149” ve “Ç 1252” çeşitlerinde bulunmuştur (Çizelge 4.4.). Albino regenerasyonu en fazla % 12.82 ile “Mirzabey 2000” ve en az % 9.09 ile “Kızıltan 91” çeşidinde meydana gelmiştir (Çizelge 4.4.). En yüksek yeşil/albino regenerant oranının ise “Kızıltan 91” genotipinde olduğu belirlenmiştir ($P<0.01$).



Şekil 4.3. Buğday genotiplerinin NaCl+Kalsiyum uygulamasına cevabı

Çizelge 4.4. Buğday genotiplerinin NaCl+Kalsiyum uygulamasına cevabı

Çeşitler	Kallus üreten anter sayısı (n)	Regenerasyon**						
		Yeşil (n)		Albino (n)		Toplam (n)		Yeşil/Albino
		(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	
Kızıltan 91	77	18	23.37 ^{ab}	7	9.09 ^b	25	32.46 ^b	2.57 ^a
Kunduru 1149	72	15	20.83 ^b	9	12.50 ^a	24	33.33 ^b	1.66 ^c
Mirzabey 2000	39	10	25.64 ^a	5	12.82 ^a	15	38.46 ^a	2 ^{bc}
Ç 1252	51	11	21.56 ^b	5	9.80 ^b	16	31.37 ^b	2.20 ^b
Toplam	239	54	22.59	26	10.87	80	33.47	2.07

* Her sütunda ayrı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir (P<0.01)

** Kullanılan her 100 kallus için regenerasyon oranı

4.3.1. NaCl+Ca kombinasyonunun buğday genotiplerinin regenerasyon yeteneğine etkisi

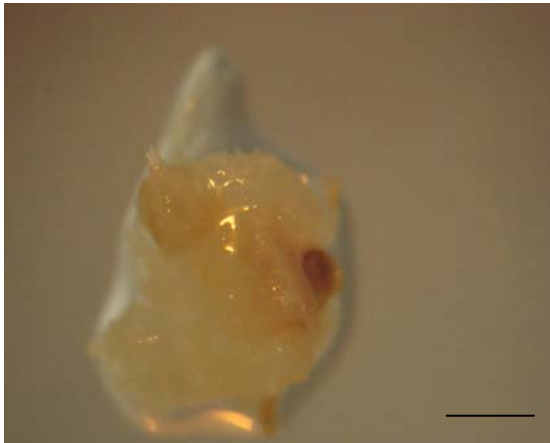
“Kızıltan 91” çeşidinde çeşitli NaCl konsantrasyonları x kalsiyum kombinasyonun bulunduğu regenerasyon ortamına alınan 77 kallustan % 23.37 yeşil ve % 9.09 albino olmak üzere % 32.46 regenerant elde edilmiştir (Çizelge 4.4). En yüksek regenerasyon oranı % 40.0 ile 0,5 mM NaCl+Ca uygulamasında görülürken, diğer uygulamalarda bu miktar sırasıyla % 16 ve % 8.19 oranında düşüş göstererek % 24.0 ve % 31.81 olarak bulunmuştur ($P<0.01$) (Çizelge 4.5.). Yeşil regenerant üretiminde en yüksek değerin % 26.66 ile yine 0.5 mM NaCl+Ca uygulamasında olduğu görülmüştür (Çizelge 4.5.). Albino üretimi ise 0.5 ve 1.5 mM NaCl+Ca uygulamalarında neredeyse eşit oranda meydana gelmiş, 1 mM NaCl+Ca uygulamasında ise albino oluşmamıştır (Şekil 4.5.). En yüksek yeşil/albino regenerant oranının 1 mM NaCl+Ca uygulamasında olduğu belirlenmiştir ($P<0.01$) (Çizelge 4.5.).

“Kunduru 1149” çeşidinde modifiye edilmiş MMS3 regenerasyon ortamlarına alınan 72 kallustan % 33.33 oranında regenerant üretilmiştir (Çizelge 4.4.). Bu oranın % 20.83’ünü yeşil, % 12.50’sini albinolar oluşturmuştur. Toplam regenerasyon, yeşil ve albino regenerant üretiminde en yüksek değerlerin sırasıyla % 41.37, % 24.13 ve % 17.24 ile 1 mM NaCl+Ca uygulamasında olduğu bulunmuştur ($P<0.01$) (Çizelge 4.5.). En düşük albino üretiminin ise % 8.69 ile ve en yüksek yeşil/albino regenerant oranının 0.5 mM NaCl+Ca uygulamasında olduğu belirlenmiştir.

“Mirzabey 2000” çeşidinde NaCl ve Ca eklenmiş regenerasyon ortamına alınan 39 kallustan % 25.64 yeşil ve % 12.82 albino olmak üzere % 38.46 oranında regenerant elde edilmiştir (Çizelge 4.4.). 1 mM NaCl+Ca en yüksek regenerant (% 41.66) üreten uygulama olmuştur ($P<0.01$). Yeşil regenerant üretimi en fazla % 27.27 ile 1.5 mM NaCl+Ca uygulamasından elde edilirken ($P<0.05$), diğer iki uygulamada bu değerin eşit oranda (% 25) olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.5.). Albino üretiminde en yüksek değer 0.5 mM NaCl+Ca, en düşük değer ise 1.5 mM NaCl+Ca uygulamasında

bulunmuştur (Şekil 4.5.). Yeşil/albino regenerant oranının en yüksek 1.5 mM NaCl+Ca uygulamasında olduğu görülmüştür ($P<0.01$) (Çizelge 4.5.).

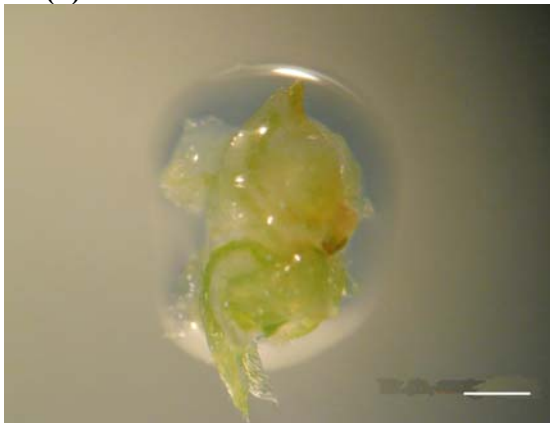
“Ç 1252” çeşidinde çeşitli NaCl konsantrasyonları x kalsiyum kombinasyonun bulunduğu regenerasyon ortamına alınan 51 kallustan % 21.56 yeşil ve % 9.80 albino olmak üzere % 31.37 regenerant elde edilmiştir (Çizelge 4.4.). En yüksek regenerasyon oranı % 36.84 ve % 35.71 ile 0.5 ve 1 mM NaCl+Ca uygulamalarında görülmüştür ($P<0.01$). Yeşil regenerant üretiminde en yüksek değerin % 28.57 ve % 26.31 ile yine bu iki uygulamada olduğu bulunmuştur ($P<0.01$) (Çizelge 4.5.). Albino üretimi ise 0.5 ve 1.5 mM NaCl+Ca uygulamalarında neredeyse eşit oranda, 1 mM NaCl+Ca uygulamasında ise % 7.14 oranında meydana gelmiştir (Şekil 4.5.). En yüksek yeşil/albino regenerant oranının 1 mM NaCl+Ca uygulamasında olduğu belirlenmiştir ($P<0.01$) (Çizelge 4.5.).



(a)



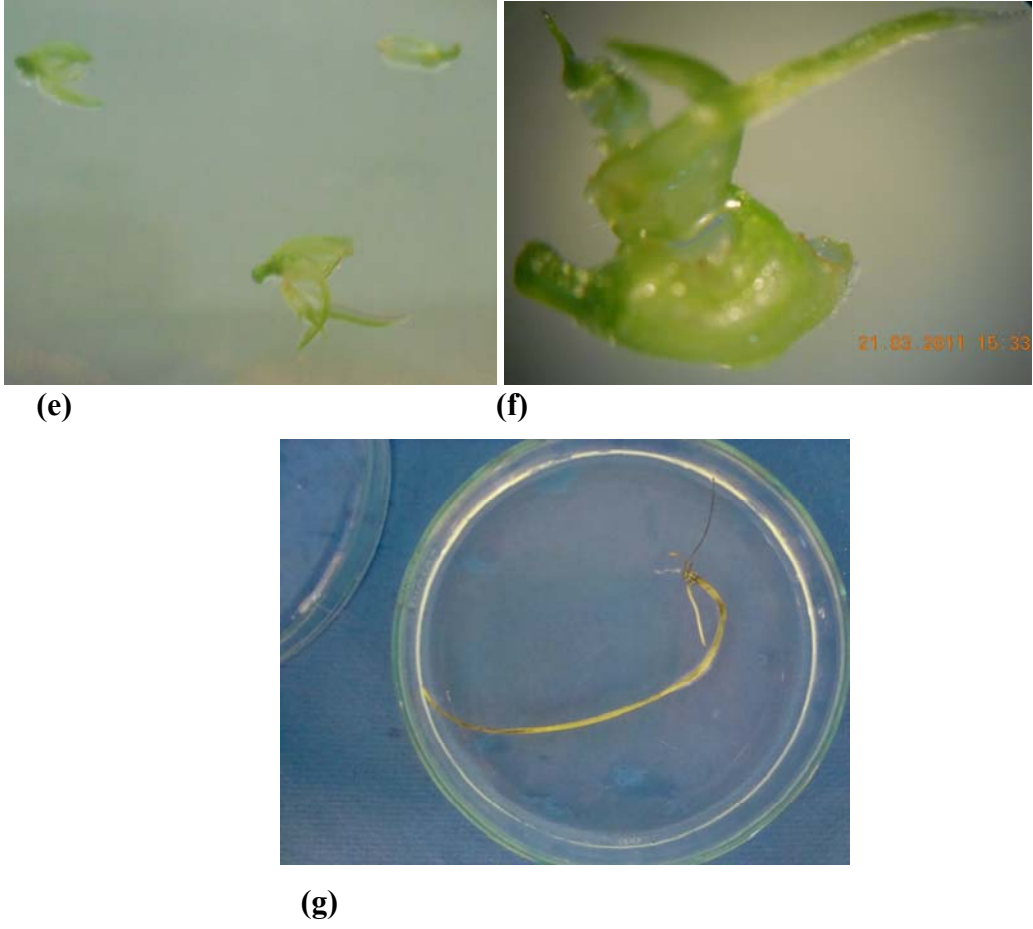
(b)



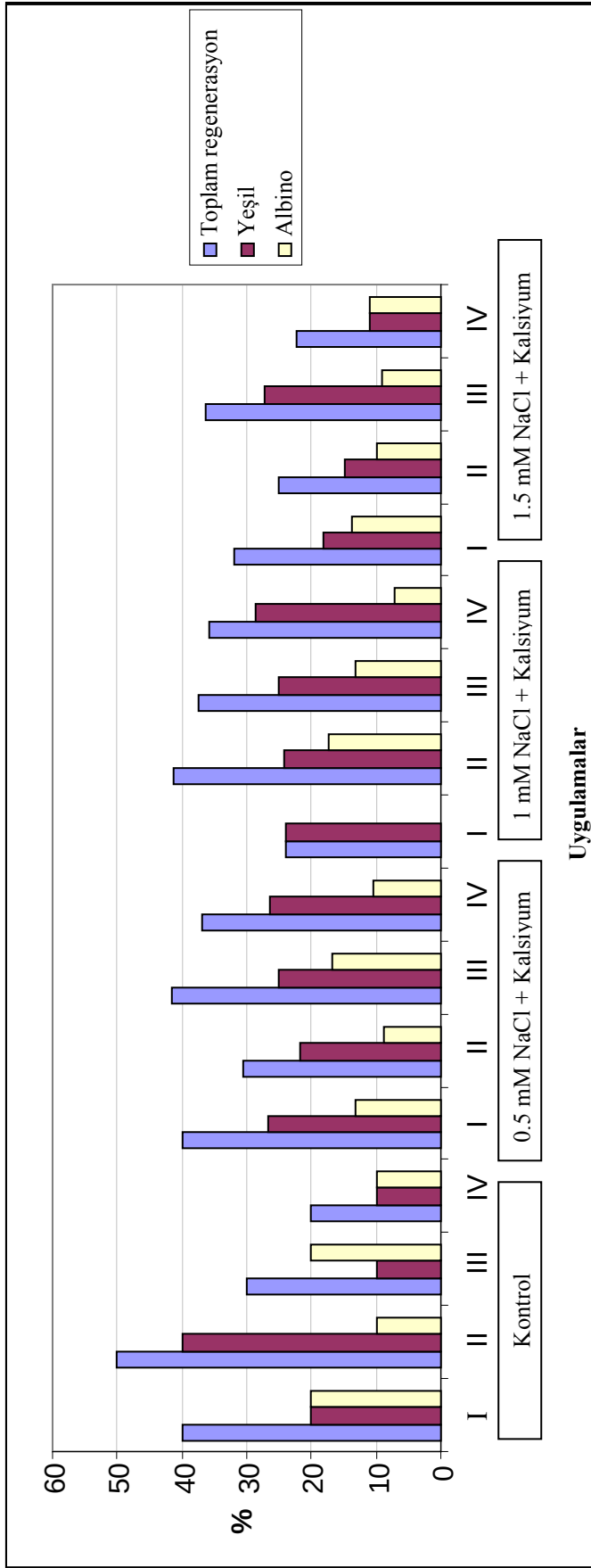
(c)



(d)



Şekil 4.4. NaCl+Kalsiyum içeren ortamlarda bulunan kallus ve oluşan regenerantlar, a) “Mirzabey-2000” çeşidine ait 1 mM NaCl + Ca ile modifiye edilmiş MMS3 ortamına alınmış bazı bölgeleri kahverengileşmeye başlamış kallus, b-c) “Kızıltan 91” çeşidine ait farklılaşmaya başlamış kalluslar, d) “Kızıltan 91”de kök ve gövde gelişimi başlayan 6 haftalık kallus, e-f) Modifiye MMS3 ortamında anter kültürünün başlangıcından itibaren 8 hafta sonra gelişen yeşil regenerantlar g) “Kızıltan-91” çeşidine ait kontrol gurubundan elde edilen regenere bitki (Bar: 1000 μ m)



Şekil 4.5. NaCl+Kalsiyum kombinasyonunun buğday genotiplerinin regenerasyon yeteneğine etkisi
 I= “Kızıltan 91” II= “Kunduru 1149” III= “Mirzabey 2000” ve IV= “Ç 1252”

Çizelge 4.5. NaCl+Kalsiyum kombinasyonun buğday genotiplerinin regenerasyon yeteneğine etkisi

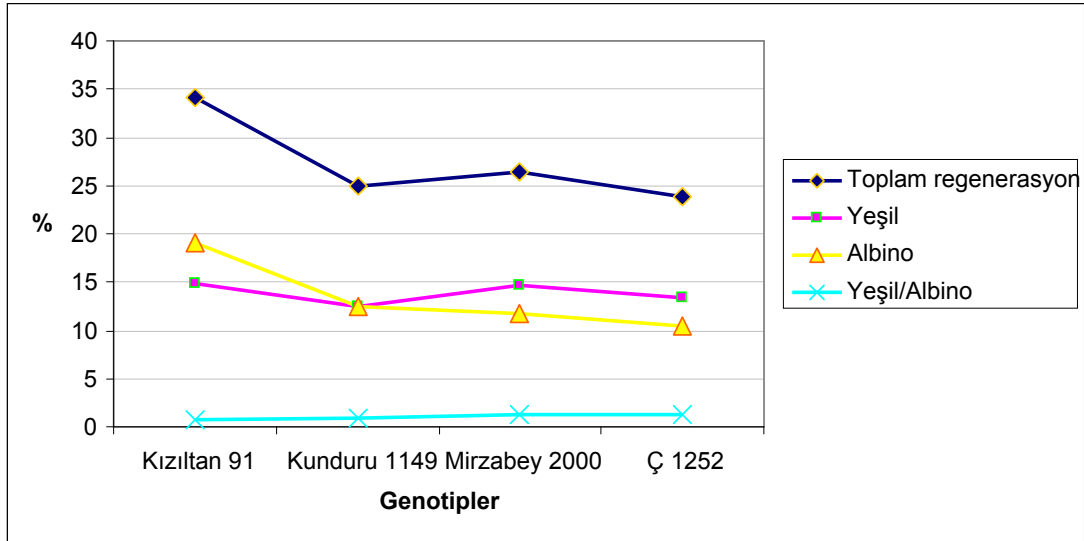
Çeşitler	Uygulamalar	Kallus üreten anter sayısı (n)	Regenerasyon**						
			Yeşil (n) (%)		Albino (n) (%)		Toplam (n) (%)		Yeşil/ Albino
Kızıltan 91	Kontrol	10	2	20.00 ^b	2	20.00 ^a	4	40.00 ^a	1 ^c
	0.5 mM NaCl + Ca	30	8	26.66 ^a	4	13.33 ^b	12	40.00 ^a	2 ^b
	1 mM NaCl + Ca	25	6	24.00 ^a	0	0 ^c	6	24.00 ^c	>6 ^a
	1.5 mM NaCl + Ca	22	4	18.18 ^b	3	13.63 ^b	7	31.81 ^b	1.33 ^c
Kunduru 1149	Kontrol	10	4	40.00 ^a	1	10.00 ^b	5	50.00 ^a	4 ^a
	0.5 mM NaCl + Ca	23	5	21.73 ^b	2	8.69 ^b	7	30.43 ^c	2.5 ^b
	1 mM NaCl + Ca	29	7	24.13 ^b	5	17.24 ^a	12	41.37 ^b	1.4 ^c
	1.5 mM NaCl + Ca	20	3	15.00 ^c	2	10.00 ^b	5	25.00 ^d	1.5 ^c
Mirzabey 2000	Kontrol	10	1	10.00 ^c	2	20.00 ^a	3	30.00 ^c	0.5 ^d
	0.5 mM NaCl + Ca	12	3	25.00 ^b	2	16.66 ^b	5	41.66 ^a	1.5 ^c
	1 mM NaCl + Ca	16	4	25.00 ^b	2	13.33 ^c	6	37.50 ^b	2 ^b
	1.5 mM NaCl + Ca	11	3	27.27 ^a	1	9.09 ^d	4	36.36 ^b	3 ^a
Ç 1252	Kontrol	10	1	10.00 ^c	1	10.00 ^a	2	20.00 ^b	1 ^c
	0.5 mM NaCl + Ca	19	5	26.31 ^a	2	10.52 ^a	7	36.84 ^a	2.5 ^b
	1 mM NaCl + Ca	14	4	28.57 ^a	1	7.14 ^b	5	35.71 ^a	4 ^a
	1.5 mM NaCl + Ca	18	2	11.11 ^b	2	11.11 ^a	4	22.22 ^b	1 ^c

* Her sütunda aynı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir (P<0.01)

** Kullanılan her 100 kallus için regenerasyon oranı

4.4. Buğday Genotiplerinin NaCl+Prolin Uygulamasına Cevabı

NaCl ve prolin ile modifiye edilen regenerasyon ortamına alınan 196 kallustan % 13.77 yeşil ve % 13.26 albino olmak üzere toplamda % 27.04 oranında regenerant elde edilmiştir (Çizelge 4.6.). “Kızıltan 91” % 34.04 ile en yüksek değerde regenerant üreten çeşit olurken ($P<0.05$), en düşük regenerasyon % 23.88 ile “Ç 1252” çeşidinde meydana gelmiştir (Çizelge 4.6.). “Kızıltan 91” ve “Mirzabey 2000” yeşil regenerant üretiminde en iyi değeri veren (% 14.89 ve % 14.70) iki çeşit olmuştur (Şekil 4.6.). En düşük yeşil regenerant üretimi ise % 12.50 ile “Kunduru 1149” çeşidinden elde edilmiştir ($P<0.05$) (Çizelge 4.6.). Albino regenerasyonu en fazla % 19.14 ile “Kızıltan 91” ($P<0.05$) ve en az % 10.44 ile “Ç 1252” çeşidinde meydana gelmiştir. En yüksek yeşil/albino regenerant oranının ise “Ç 1252” ve “Mirzabey 2000” çeşitlerinde olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.6.).



Şekil 4.6. Buğday genotiplerinin NaCl+Prolin uygulamasına cevabı

Çizelge 4.6. Buğday genotiplerinin NaCl+Prolin uygulamasına cevabı

Çeşitler	Kallus üreten anter sayısı (n)	Regenerasyon**					
		Yeşil		Albino		Toplam	
		(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
Kızıltan 91	47	7	14.89 ^a	9	19.14 ^a	16	34.04 ^a
Kunduru 1149	48	6	12.50 ^b	6	12.50 ^b	12	25.00 ^{bc}
Mirzabey 2000	34	5	14.70 ^a	4	11.76 ^{bc}	9	26.47 ^b
Ç 1252	67	9	13.43 ^{ab}	7	10.44 ^c	16	23.88 ^c
Toplam	196	27	13.77	26	13.26	53	27.04
							1.03

* Her sütunda ayrı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir (P<0.05)

**Kullanılan her 100 kallus için regenerasyon oranı

4.4.1. NaCl + Prolin kombinasyonunun buğday genotiplerinin regenerasyon yeteneğine etkisi

“Kızıltan 91” çeşidinde NaCl ve prolin eklenmiş regenerasyon ortamına alınan 39 kallustan % 14.89 yeşil ve % 19.14 albino olmak üzere % 34.04 oranında regenerant elde edilmiştir (Çizelge 4.6.). 1 mM NaCl+prolin en yüksek regenerant (% 46.66) üreten uygulama olmuştur ($P<0.01$) (Çizelge 4.7.). Yeşil regenerant üretimi en fazla % 18.75 ile 0.5 ve 1.5 mM NaCl+prolin uygulamalarından elde edilirken ($P<0.01$) (Şekil 4.7.e) diğer uygulamada bu değer % 6.66 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.8.). Albino bitki üretiminde en yüksek değer 1 mM NaCl+prolin, en düşük değer ise 0.5 mM NaCl+prolin uygulamasında bulunmuştur. Yeşil/albino regenerant oranının en yüksek 0.5 mM NaCl+prolin uygulamasında olduğu görülmüştür ($P<0.01$) (Çizelge 4.7.).

“Kunduru 1149” çeşidinde çeşitli NaCl konsantrasyonları x prolin kombinasyonun bulunduğu regenerasyon ortamına alınan 48 kallustan eşit oranda yeşil ve albino (% 12.50) regenerant elde edilmiş ve toplam regenerasyon % 25.00 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.6.). En yüksek regenerasyon oranı % 30.76 ile 0.5 mM NaCl+prolin uygulamasında görülmüştür ($P<0.01$) (Şekil 4.8.). Yeşil regenerant üretiminde en yüksek değer % 21.42 ile 1 mM NaCl+prolin uygulamasında bulunurken (Şekil 4.7.f-g), 1.5 mM NaCl+prolin uygulamasında yeşil regenerant meydana gelmemiştir. Albino üretimi 0.5 mM NaCl+prolin uygulamasında en yüksek değerde bulunmuş (% 19.23) (Şekil 4.7.c), 1 mM NaCl+prolin uygulamasında ise albino oluşumu gözlenmemiştir. En yüksek yeşil/albino regenerant oranının 1 mM NaCl+prolin uygulamasında olduğu belirlenmiştir ($P<0.01$) (Çizelge 4.7.).

“Mirzabey 2000” çeşidinde çeşitli NaCl konsantrasyonları x prolin kombinasyonun bulunduğu regenerasyon ortamına alınan 34 kallustan % 14.70 yeşil ve % 11.76 albino olmak üzere % 26.47 regenerant elde edilmiştir (Şekil 4.7.a-b) (Çizelge 4.6.). En yüksek regenerasyon oranı % 30.00 ile 0.5 ve 1 mM NaCl+prolin uygulamalarında eşit oranda meydana gelmiştir. Yeşil regenerant üretiminde en yüksek değer % 20.00 ile yine 0.5 ve 1 mM NaCl+prolin uygulamalarında olduğu bulunmuştur ($P<0.01$) (Şekil 4.8.). Albino üretimi ise 1.5 mM NaCl uygulamasında

en yüksek değerde bulunurken (% 14.28), 0.5 ve 1.5 mM NaCl+prolin uygulamalarında eşit oranda (% 10) meydana gelmiştir (Çizelge 4.7.). En yüksek yeşil/albino regenerant oranının 0.5 ve 1 mM NaCl+prolin uygulamalarında olduğu belirlenmiştir ($P<0.01$) (Çizelge 4.7.).

“Ç 1252” çeşidinde modifiye edilmiş MMS3 regenerasyon ortamlarına alınan 67 kallustan % 23.88 oranında regenerant üretilmiştir. Bu oranın % 13.43’ünü yeşil, % 10.44’ünü albinolar oluşturmuştur (Çizelge 4.6.). Toplam regenerasyon ve yeşil regenerant miktarında en yüksek değerlerin sırasıyla % 28.57 ile 0.5 mM NaCl+prolin uygulamasında olduğu bulunmuştur ($P<0.01$) (Şekil 4.7.h, Şekil 4.8.). Bunu % 23.52 ile 1 mM NaCl+prolin uygulaması izlemektedir (Şekil 4.7.d). 0.5 mM NaCl+prolin uygulamasında albino oluşmazken, 1.5 mM NaCl+prolin uygulamasında bu oran % 16.66 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.7.). En yüksek yeşil/albino regenerant oranının 0.5 mM NaCl+prolin uygulamasında olduğu belirlenmiştir ($P<0.01$) (Çizelge 4.7.).



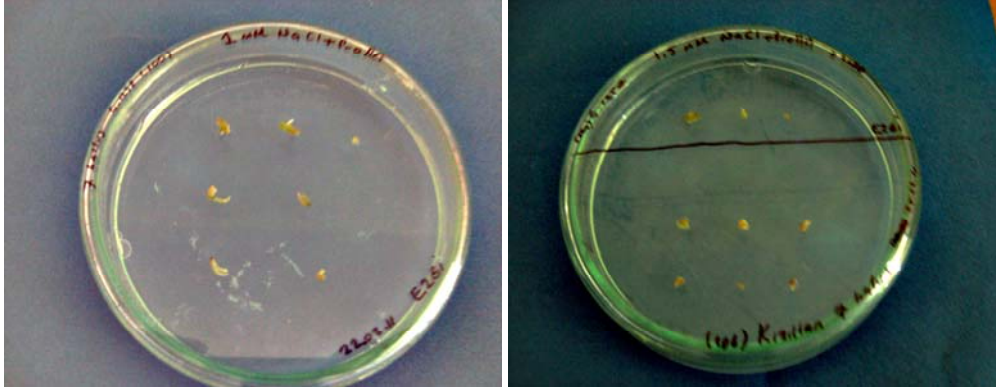
(a)



(b)

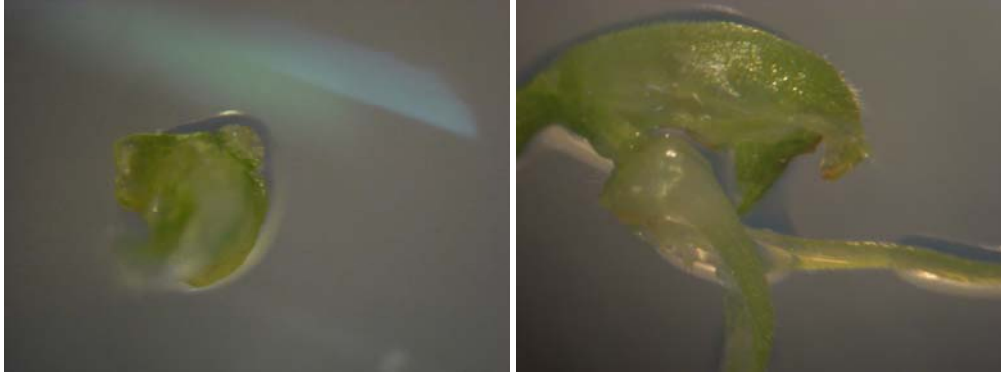


(c)



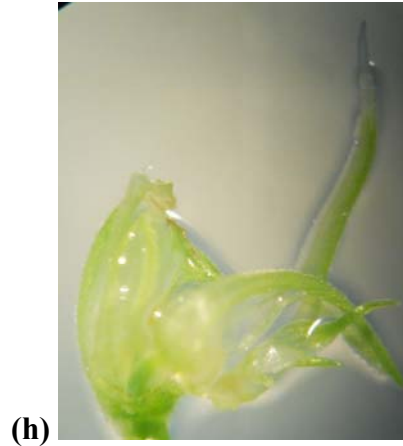
(d)

(e)



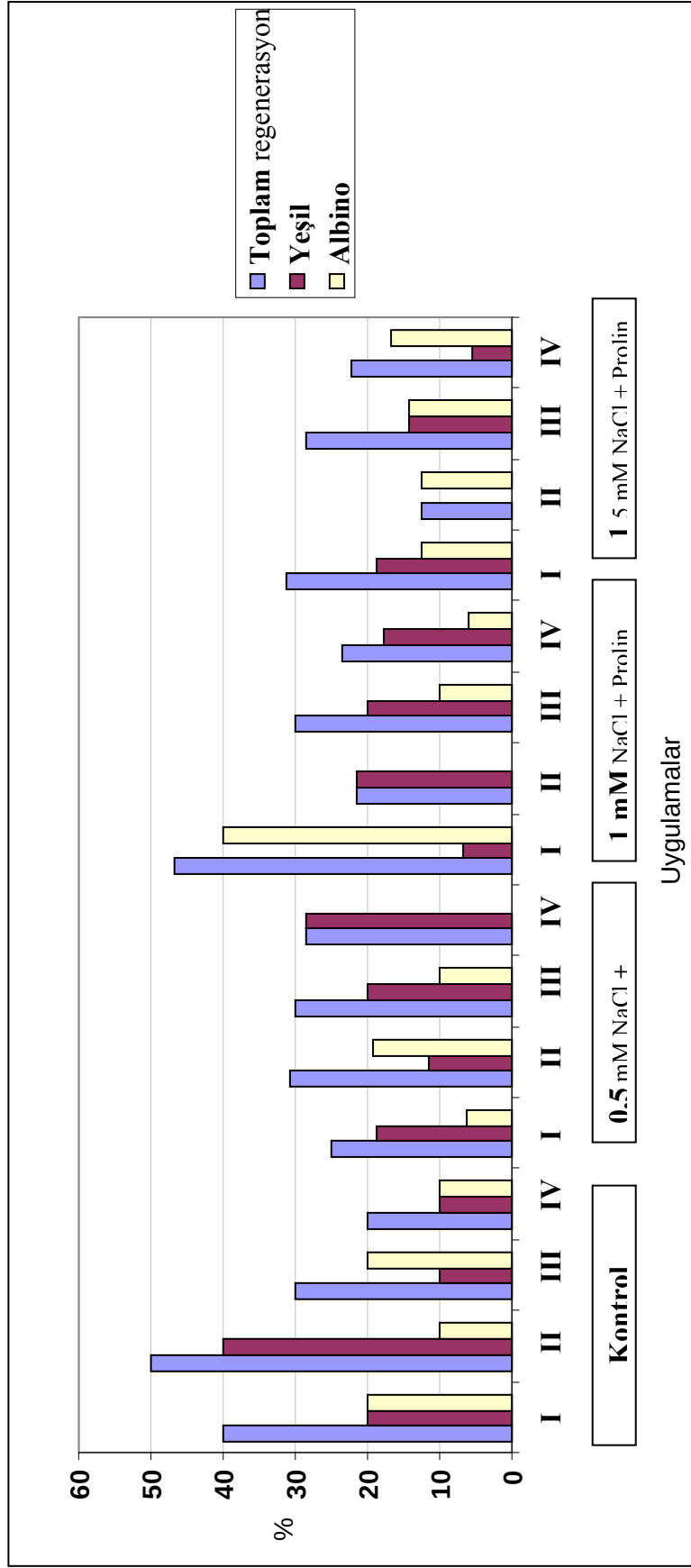
(f)

(g)



(h)

Şekil 4.7. NaCl+prolin ile modifiye edilmiş MMS3 ortamında meydana gelen regenerantlar, a-b) “Mirzabey 2000” çeşidinden elde edilen regenerantlar, c) 0,5 mM NaCl+prolin içeren MMS3 ortamında “Kundurdu 1149” çeşidinden üretilen albinolar, d) 1 mM NaCl+prolin içeren ortamda “Ç-1252” çeşidinden elde edilen regenerantlar, e) 1,5 mM NaCl+prolin ortamında “Kızıltan-91” çeşitlerinden elde edilen regenerantlar, f-g) 1 mM NaCl+prolin içeren regenerasyon ortamında “Kundurdu 1149” çeşidinden elde edilen yeşil regenerantlar, h) 0,5 mM NaCl+ prolin ortamında “Ç 1252” çeşidinden elde edilen regenerant



Şekil 4.8. NaCl+Prolin kombinasyonunun buğday genotiplerinin regenerasyon yeteneğine etkisi
 I= “Kızıltan 91” II= “Kunduru 1149” III= “Mirzabey 2000” ve IV= “Ç 1252”

Çizelge 4.7. NaCl+Prolin kombinasyonun buğday genotiplerinin regenerasyon yeteneğine etkisi

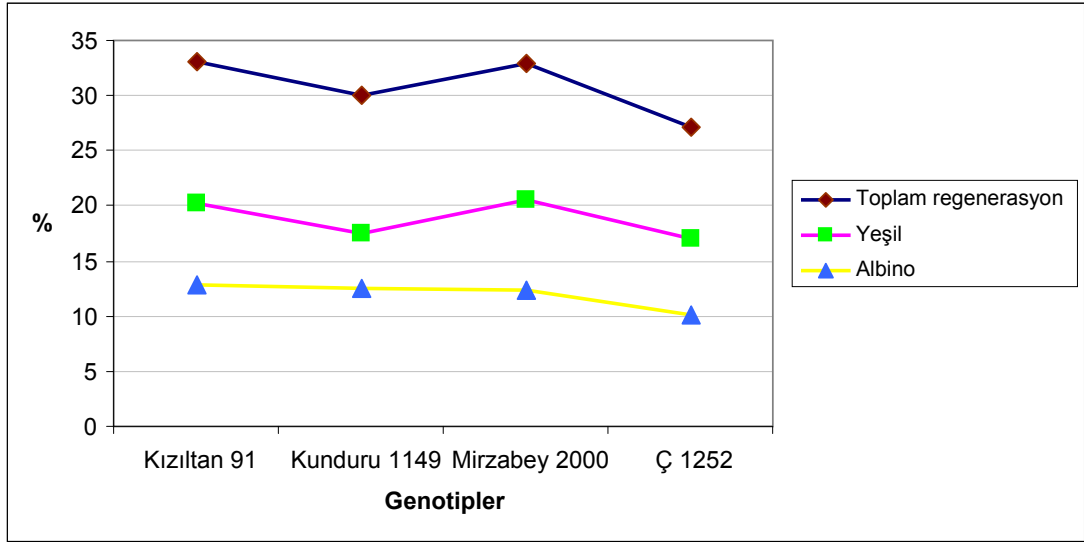
Çeşitler	Uygulamalar	Kallus üreten anter sayısı (n)	Regenerasyon**					
			Yeşil		Albino		Toplam	Yeşil/ Albino
			(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
Kızıltan 91	Kontrol	10	2	20.00 ^a	2	20.00 ^b	4	40.00 ^b
	0.5 mM NaCl + Prolin	16	3	18.75 ^a	1	6.25 ^d	4	25.00 ^d
	1 mM NaCl + Prolin	15	1	6.66 ^b	6	40.00 ^a	7	46.66 ^a
	1.5 mM NaCl + Prolin	16	3	18.75 ^a	2	12.50 ^c	5	31.25 ^c
Kunduru 1149	Kontrol	10	4	40.00 ^a	1	10.00 ^c	5	50.00 ^a
	0.5 mM NaCl + Prolin	26	3	11.53 ^c	5	19.23 ^a	8	30.76 ^b
	1 mM NaCl + Prolin	14	3	21.42 ^b	0	0 ^d	3	21.42 ^c
	1.5 mM NaCl + Prolin	8	0	0 ^d	1	12.50 ^b	1	12.50 ^d
Mirzabey 2000	Kontrol	10	1	10.00 ^c	2	20.00 ^a	3	30.00 ^a
	0.5 mM NaCl + Prolin	10	2	20.00 ^a	1	10.00 ^c	3	30.00 ^a
	1 mM NaCl + Prolin	10	2	20.00 ^a	1	10.00 ^c	3	30.00 ^a
	1.5 mM NaCl + Prolin	14	1	14.28 ^b	2	14.28 ^b	3	28.57 ^a
Ç 1252	Kontrol	10	1	10.00 ^c	1	10.00 ^b	2	20.00 ^c
	0.5 mM NaCl + Prolin	14	4	28.57 ^a	0	0 ^d	4	28.57 ^a
	1 mM NaCl + Prolin	17	3	17.64 ^b	1	5.88 ^c	4	23.52 ^b
	1.5 mM NaCl + Prolin	36	2	5.55 ^d	6	16.66 ^a	8	22.22 ^b

* Her sütunda aynı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir (P<0.05)

**Kullanılan her 100 kallus için regenerasyon oranı

4.5. Buğday Genotiplerine Uygulanan NaCl konsantrasyonlarına Ajanların (Kalsiyum ve Prolin) Etkilerinin Toplu Sonuçları

NaCl+Ajanlar ilavesi ile modifiye edilen MMS3 regenerasyon ortamına alınan 435 kallustan % 18.62 yeşil ve % 11.95 albino olmak üzere % 30.57 oranında regenerant elde edilmiştir (Çizelge 4.8.). Genotipler arasında en yüksek regenerasyon % 33.06 ile “Kızıltan 91” çeşidinde meydana gelirken bunu % 32.87 ile “Mirzabey 2000” çeşidi izlemiştir ($P<0.01$). En iyi yeşil regenerant üretim yeteneği yine bu iki genotipte görülmüştür (% 20.16 ve % 20.54). “Kızıltan 91” en yüksek albino üreten (% 12.90) çeşit olurken bunu % 12.50 ile “Kunduru 1149” çeşidi izlemektedir (Şekil 4.9.). Fakat bu fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (Çizelge 4.8.).



Şekil 4.9. Buğday genotiplerine uygulanan NaCl konsantrasyonlarına ajanların (Kalsiyum ve Prolin) etkilerinin toplu sonuçları

Çizelge 4.8. Buğday genotiplerine uygulanan NaCl konsantrasyonlarına ajanların (Kalsiyum ve Prolin) etkilerinin toplu sonuçları

Genotipler	Kallus üreten anter sayısı (n)	Regenerasyon**					
		Yeşil		Albino		Toplam	
		(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
Kızıltan 91	124	25	20.16 ^{ab}	16	12.90 ^a	41	33.06 ^a
Kunduru 1149	120	21	17.50 ^{bc}	15	12.50 ^a	36	30.00 ^b
Mirzabey 2000	73	15	20.54 ^a	9	12.32 ^a	24	32.87 ^a
Ç 1252	118	20	16.94 ^c	12	10.16 ^a	32	27.11 ^c
Toplam	435	81	18.62	52	11.95	133	30.57

* Her sütunda ayrı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir (P<0.01)

** Kullanılan her 100 kallus için regenerasyon oranı

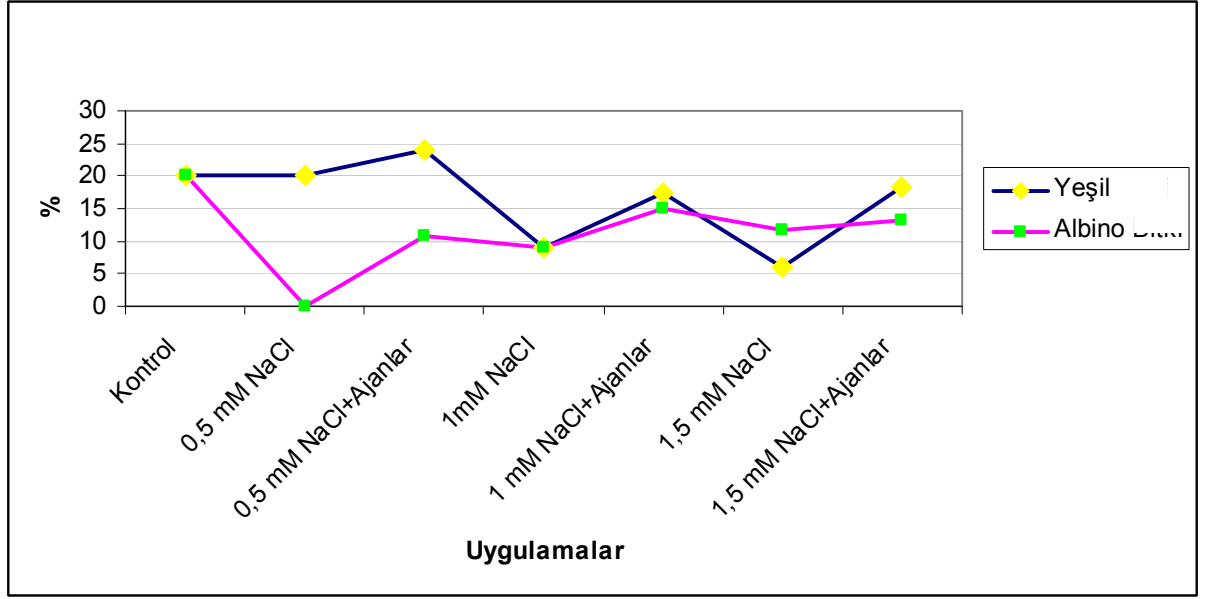
4.5.1. NaCl ve NaCl+ajanların (kalsiyum ve prolin) buğday genotiplerinin regenerasyon yeteneğine etkisinin toplu sonuçları

4.5.1.1. “Kızıltan 91” çeşidine ait toplu sonuçlar

“Kızıltan 91” çeşidinde tuza ilave olarak verilen ajanlar toplam regenerasyonu, yeşil ve albino üretimini çeşitli derecelerde iyileştirmiştir. Kontrol gurubunda % 40 olan regenerasyon oranı 0.5 mM NaCl’da % 20, 1 mM NaCl’da % 18.18 ve 1.5 mM NaCl’da % 17.64 olarak azalma göstermiştir ($P<0.01$) (Şekil 4.10.). Ajanların tuzlu ortama eklenmesi ile regenerasyon miktarı 0.5 mM NaCl uygulamasında % 34.78, 1 mM NaCl uygulamasında % 32.50 ve 1.5 mM NaCl uygulamasında % 31.57 olarak bulunmuştur ($P<0.01$) (Çizelge 4.9.).

Yeşil regenerant miktarı tuzlu koşullarda kontrole göre 0.5 mM NaCl uygulaması haricinde düşüş göstermiştir. NaCl uygulamalarında (0.5, 1 ve 1.5 mM) kültür ortamına ajanların eklenmesi ile yeşil regenerant üretiminin sırasıyla % 3.91, % 8.41 ve % 12.54 oranında artarak % 23.91, % 17.50 ve % 18.42 miktarında olduğu bulunmuştur ($P<0.01$) (Çizelge 4.9.). Albino üretimi ise kontrole göre NaCl uygulamaları ile (% 20, % 10.91 ve % 8.24) düşmüş, ortama ajanların eklenmesi ile belirli derecelerde artmıştır. Bu artış 0.5 mM NaCl’da % 10.86, 1 mM NaCl’da % 5.91 ($P<0.01$) ve 1.5 mM NaCl’da ise % 1.39 oranındadır.

En iyi bitki regenerasyonu kontrol gurubu (Şekil 4.4.g) ve 0.5 mM NaCl+Ajanlar uygulamasında (% 34.78), en düşük regenerasyon ise 1.5 mM NaCl uygulamasında % 17.64 oranında meydana gelmiştir. Yeşil regenerant miktarı en yüksek % 23.91 ile 0.5 mM NaCl+Ajanlar uygulamasında ($P<0.01$), albino miktarı en fazla % 20.00 ve % 15.00 ile kontrol gurubu ve 1 mM NaCl+Ajanlar uygulamasından elde edilmiştir. 0.5 mM NaCl uygulamasında ise albino oluşmamıştır (Çizelge 4.9.).



Şekil 4.10. NaCl ve NaCl+Ajanların (Kalsiyum ve Prolin) “Kızıltan 91” çeşidi regenerasyon yeteneğine etkisi

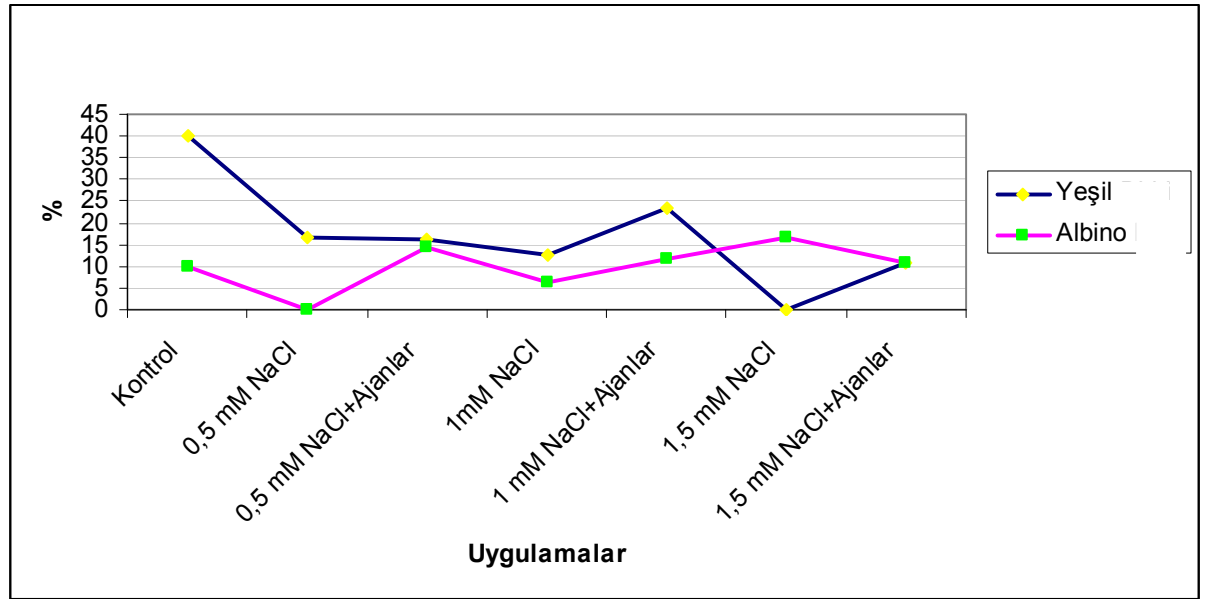
4.5.1.2. “Kunduru 1149” çeşidine ait toplu sonuçlar

“Kunduru 1149” çeşidinde tuza ilave olarak verilen ajanlar çoğu uygulamada toplam regenerasyonu, yeşil ve albino regenerant üretimini çeşitli derecelerde iyileştirmiştir. Kontrol gurubunda % 50 olan bitki regenerasyonu 0.5 ve 1.5 mM NaCl’da % 33.34, 1 mM NaCl’da % 31.25 oranında düşüş göstererek sırasıyla % 16.66, % 18.64 ve % 16.66 olarak bulunmuştur ($P<0.01$) (Çizelge 4.10.). Ajanların tuzlu regenerasyon ortamına eklenmesi ile regenerasyon miktarı 0.5 mM NaCl uygulamasında % 30.61, 1 mM NaCl uygulamasında % 34.88 ve 1.5 mM NaCl uygulamasında % 21.42’ye yükselmiştir ($P<0.01$) (Şekil 4.11.).

Yeşil regenerant miktarı tüm NaCl uygulamalarında kontrole göre düşüş göstermiştir. Bu düşüş en fazla 1.5 mM NaCl uygulamasında görülmüştür (% 40) ($P<0.01$). 0.5 mM NaCl uygulamasında ajanların eklenmesi ile yeşil regenerant üretimi % 0.34 oranında düşerken, 1 ve 1.5 mM NaCl uygulamalarında sırasıyla % 10.75 ve % 10.71 oranında artarak % 23.25 ve % 10.74’e yükselmiştir ($P<0.01$) (Çizelge 4.10.). Albino üretimi ise 0.5 ve 1 mM NaCl uygulamalarında kontrole göre düşüş gösterirken, 1.5 mM NaCl uygulamasında % 6.66 oranında artmıştır. Ortama

ajanların eklenmesi ile albino üretimi 0.5 ve 1 mM NaCl uygulamalarında sırasıyla % 14.28 ve % 5.37 oranında artarak % 14.28 ve % 11.62'ye yükselmiş, 1.5 mM NaCl uygulamasında ise % 5.95 oranında azalarak % 10.71'e düşmüştür ($P<0.01$) (Çizelge 4.10.).

Kontrol gurubundan sonra (% 50) regenerasyon en fazla 1 mM NaCl+Ajanlar uygulamasında % 34.88 ve 0.5 mM NaCl+Ajanlar uygulamasında % 30.61 olarak meydana gelmiştir. En düşük regenerasyonun % 16.66 ile 0.5 mM NaCl ve 1.5 mM NaCl uygulamalarında olduğu belirlenmiştir. En yüksek yeşil regenerant miktarının % 23.25 ile 1 mM NaCl+Ajanlar uygulamasında meydana gelerek kontrol gurubunu (% 40) takip ettiği görülmüştür ($P<0.01$). 1.5 mM NaCl uygulamasından yeşil regenerant elde edilemezken 1.5 mM NaCl+Ajanlar uygulamasından yine düşük (% 10.71) oranda yeşil regenerant oluşmuştur. Albino üretimi en fazla % 16.66 ile 1.5 mM NaCl+Ajanlar uygulamasında meydana gelmiştir ($P<0.01$). 0.5 mM NaCl uygulamasında ise albino oluşmamıştır (Çizelge 4.10.).



Şekil 4.11. NaCl ve NaCl+Ajanların (Kalsiyum ve Prolin) “Kunduru 1149” çeşidi regenerasyon yeteneğine etkisi

Çizelge 4.9. NaCl ve NaCl+Ajanların (Kalsiyum ve Prolin) Kızıltan 91 çeşidi regenerasyon yeteneğine etkisinin toplu sonuçları

Çeşit	Uygulamalar	Kallus üreten anter sayısı (n)	Regenerasyon**			
			Yeşil (n)	(%)	Albino (n)	(%)
Kızıltan 91	Kontrol	10	2	20.00 ^b	2	20.00 ^a
	0.5 mM NaCl	20	4	20.00 ^b	0	0 ^e
	0.5 mM NaCl+Ajanlar	46	11	23.91 ^a	5	10.86 ^{cd}
	1 mM NaCl	11	1	9.09 ^c	1	9.09 ^d
	1 mM NaCl+Ajanlar	40	7	17.50 ^b	6	15.00 ^b
	1.5 mM NaCl	17	1	5.88 ^d	2	11.76 ^c
	1.5 mM NaCl+Ajanlar	38	7	18.42 ^b	5	13.15 ^{bc}
	Toplam	182	33	18.13	21	11.13
					54	29.67

* Her sütunda ayrı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir (P<0.01)

** Kullanılan her 100 kallus için regenerasyon oranı

Çizelge 4.10. NaCl ve NaCl+Ajanların (Kalsiyum ve Prolin) Kunduru 1149 çeşidi regenerasyon yeteneğine etkisinin toplu sonuçları

Çeşit	Uygulamalar	Kallus üreten anter sayısı (n)	Regenerasyon**					
			Yeşil (n) (%)		Albino (n) (%)		Toplam (n) (%)	
Kunduru 1149	Kontrol	10	4	40.00 ^a	1	10.00 ^c	5	50.00 ^a
	0.5 mM NaCl	6	1	16.66 ^c	0	0 ^e	1	16.66 ^e
	0.5 mM NaCl+Ajanlar	49	8	16.32 ^c	7	14.28 ^b	15	30.61 ^c
	1mM NaCl	16	2	12.50 ^d	1	6.25 ^d	3	18.75 ^e
	1 mM NaCl+Ajanlar	43	10	23.25 ^b	5	11.62 ^c	15	34.88 ^b
	1.5 mM NaCl	6	0	0 ^e	1	16.66 ^a	1	16.66 ^e
	1.5 mM NaCl+Ajanlar	28	3	10.71 ^d	3	10.71 ^c	6	21.42 ^d
	Toplam	158	28	17.72	18	11.39	46	29.11

* Her sütunda ayrı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir (P<0.01)

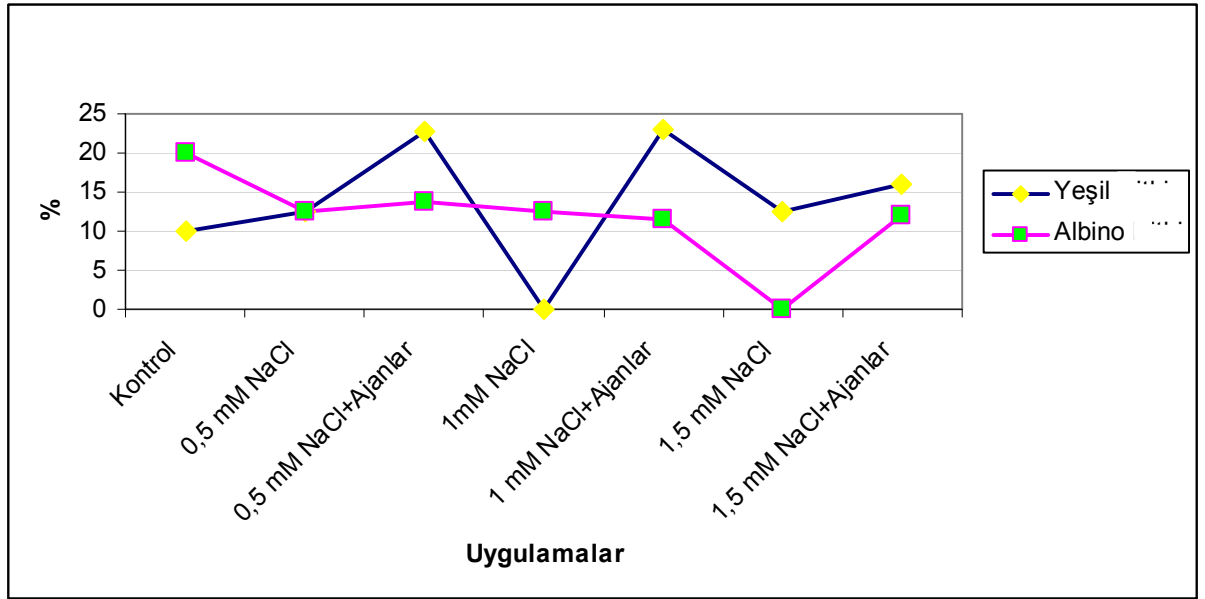
** Kullanılan her 100 kallus için regenerasyon oranı

4.5.1.3. “Mirzabey 2000” çeşidine ait toplu sonuçlar

“Mirzabey 2000” çeşidinde tuza ilave olarak verilen ajanlar toplam regenerasyonu ve yeşil regenerant üretimini çeşitli derecelerde iyileştirmiştir. Kontrol gurubunda % 30 olan regenerasyon miktarı 0.5 mM NaCl’da % 5, 1 ve 1.5 mM NaCl’da % 17.50 oranında azalarak % 25.0 ve % 12.50 olarak bulunmuştur ($P<0.01$) (Çizelge 4.11.). Ajanların tuzlu ortama eklemesi ile regenerasyon 0.5 mM NaCl uygulamasında % 11.36, 1 mM NaCl uygulamasında % 22.11 ve 1.5 mM NaCl uygulamasında % 15.50 oranında artarak sırasıyla % 36.36, % 34.61 ve % 28.0’e yükselmiştir ($P<0.01$) (Şekil 4.12.).

NaCl uygulamalarında (0.5, 1 ve 1.5 mM) kültür ortamına ajanların eklenmesi ile yeşil regenerant miktarı sırasıyla % 10.22, % 23.07 ve % 3.5 oranlarında artarak % 22.72, % 23.07 ve % 16.0’ya yükselmiştir ($P<0.01$) (Çizelge 4.11.). Albino üretimi ise tuz uygulamalarında kontrolle karşılaştırıldığında düşüş göstermiştir. Bu düşüş 0.5 ve 1 mM NaCl uygulamalarında % 7.5 iken 1.5 mM NaCl’da % 20 oranında olmuştur ($P<0.01$). Ortama ajanların eklenmesi ile 0.5 ve 1.5 mM NaCl uygulamalarında belirli derecelerde artmış, 1 mM NaCl uygulamasında ise azalmıştır (% 0.97). Fakat bu azalış istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (Çizelge 4.11.).

Regenerasyon en fazla 0.5 mM NaCl+Ajanlar ve 1 mM NaCl+Ajanlar uygulamalarında sırasıyla % 36.36 ve % 34.71 oranında meydana gelirken en düşük regenerasyonun % 12.50 ile 1 ve 1.5 mM NaCl uygulamalarında olduğu görülmüştür ($P<0.01$). Yeşil regenerant miktarının en yüksek % 23.07 ve % 22.72 ile 1 ve 0.5 mM NaCl+Ajanlar uygulamasında olduğu görülmüştür ($P<0.01$). 1 mM NaCl uygulamasında hiç kontrol, 0.5 mM NaCl ve 1.5 mM NaCl uygulamalarında ise az sayıda (% 12.50) yeşil regenerant üretilmiştir. Albino regenerasyonu en fazla kontrol gurubu (% 20) ve 0.5 mM NaCl+Ajanlar uygulamasında (% 13.63) meydana gelirken 1.5 mM uygulamasında albino oluşmamıştır (Çizelge 4.11.).



Şekil 4.12. NaCl ve NaCl+Ajanların (Kalsiyum ve Prolin) “Mirzabey 2000” çeşidi regenerasyon yeteneğine etkisi

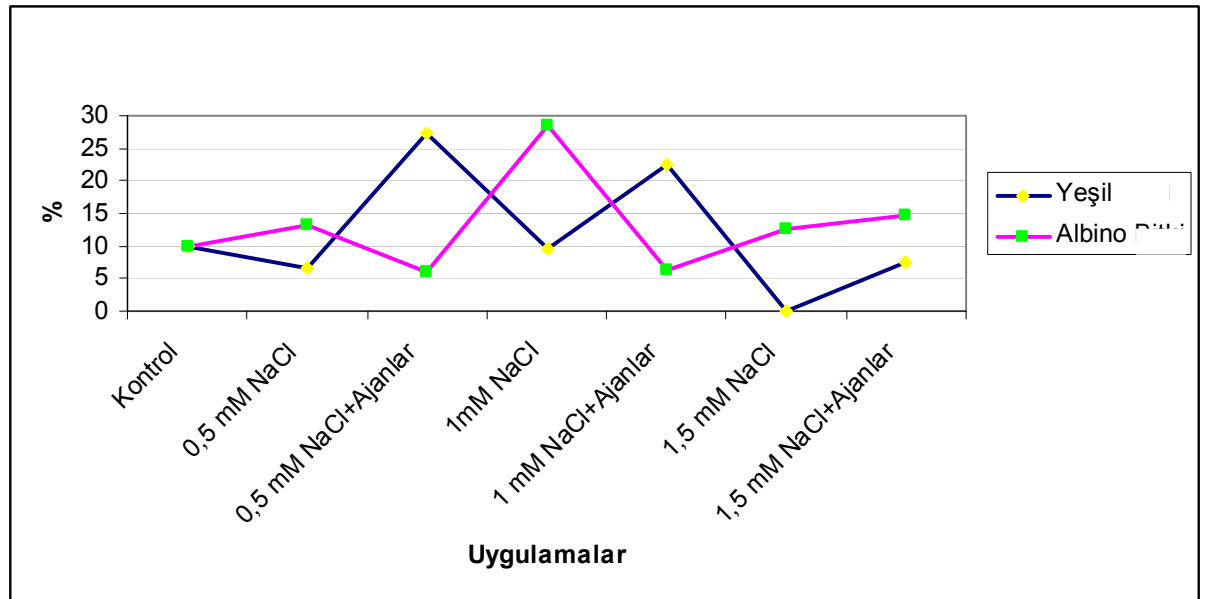
4.5.1.4. “Ç 1252” çeşidine ait toplu sonuçlar

“Ç 1252”de tuza ilave olarak verilen ajanlar çoğu uygulamada toplam regenerasyonu ve yeşil regenerant üretimini farklı oranlarda iyileştirmiştir. Kontrol grubu ve 0.5 mM NaCl’da % 20 olan regenerasyon miktarı, 1 mM NaCl’da artmış, 1.5 mM NaCl’da ise % 7.5 oranında azalarak % 12.50’ye düşmüştür ($P<0.01$) (Çizelge 4.12.). Ajanların tuzlu regenerasyon ortamına eklemesi ile regenerant miktarının 0.5 mM NaCl uygulamasında % 33.33 ve 1 mM NaCl uygulamasında % 29.03 ve 1.5 mM NaCl uygulamasında % 20.0 olduğu görülmüştür ($P<0.01$) (Şekil 4.13.).

Yeşil regenerant miktarı tüm NaCl uygulamalarında kontrole göre düşüş göstermiştir. Bu düşüş en fazla 1.5 mM NaCl uygulamasında görülmüştür (% 10) ($P<0.01$) (Çizelge 4.12.). Ajanların kültür ortamına eklenmesi ile yeşil regenerasyon tüm uygulamalarda çeşitli oranlarda (sırasıyla % 20.61, % 13.06, % 7.40) artmıştır ($P<0.01$). Albino üretiminin ise 0.5, 1 ve 1.5 mM NaCl uygulamalarında kontrole göre sırasıyla % 3.33, % 18.57 ve % 2.50 oranında artarak % 13.33, % 28.57 ve % 12.50 olduğu görülmüştür ($P<0.01$) (Çizelge 4.12.). Ortama ajanların eklenmesi ile

albino miktarı sırasıyla % 6.06, % 6,45 ve % 10.0 olarak bulunmuştur ($P<0.01$) (Çizelge 4.12.).

Regenerasyon en fazla 1 mM NaCl+Ajanlar ve 0.5 mM NaCl+Ajanlar uygulamalarında % 38.09 ve % 33.33 oranında meydana gelmiştir. En düşük regenerasyon miktarı 1.5 mM NaCl'da % 12.50 oranında bulunmuştur (Çizelge 4.12.). Yeşil regenerant miktarının en yüksek % 27.27 ile 0.5 mM NaCl+Ajanlar uygulamasında olduğu görülürken bunu % 22.58 ile 1 mM NaCl+Ajanlar uygulaması izlemiştir ($P<0.01$) (Çizelge 4.12.). 1.5 mM NaCl uygulamasında yeşil regenerant elde edilememiştir. Albino üretiminin en yüksek % 28.57 ile 1 mM NaCl uygulamasında olduğu görülürken, en düşük üretim % 6.06 ile 0.5 mM NaCl+Ajanlar uygulamasından elde edilmiştir (Çizelge 4.12.).



Şekil 4.13. NaCl ve NaCl+Ajanların (Kalsiyum ve Prolin) “Ç 1252” çeşidi regenerasyon yeteneğine etkisi

Çizelge 4.11. NaCl ve NaCl+Ajanların (Kalsiyum ve Prolin) Mirzabey 2000 çeşidi regenerasyon yeteneğine etkisinin toplu sonuçları

Çeşit	Uygulamalar	Kallus üreten anter sayısı (n)	Regenerasyon**				
			Yeşil (n) (%)		Albino (n) (%)		Toplam (n) (%)
Mirzabey 2000	Kontrol	10	1	10.00 ^d	2	20.00 ^a	3 30.00 ^b
	0.5 mM NaCl	8	1	12.50 ^c	1	12.50 ^b	2 25.00 ^c
	0.5 mM NaCl+Ajanlar	22	5	22.72 ^a	3	13.63 ^b	8 36.36 ^a
	1 mM NaCl	8	0	0 ^e	1	12.50 ^b	1 12.50 ^d
	1 mM NaCl+Ajanlar	26	6	23.07 ^a	3	11.53 ^b	9 34.61 ^a
	1.5 mM NaCl	8	1	12.50 ^c	0	0 ^c	1 12.50 ^d
	1.5 mM NaCl+Ajanlar	25	4	16.00 ^b	3	12.00 ^b	7 28.00 ^b
	Toplam	107	18	16.82	13	12.14	31 28.97

* Her sütunda ayrı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir (P<0.01)

** Kullanılan her 100 kallus için regenerasyon oranı

Çizelge 4.12. NaCl ve Ajanların (Kalsiyum ve Prolin) Ç 1252 çeşidi regenerasyon yeteneğine etkisinin toplu sonuçları

Çeşit	Uygulamalar	Kallus üreten anter sayısı (n)	Regenerasyon**				
			Yeşil		Albino		Toplam
			(n)	(%)	(n)	(%)	(n) (%)
Ç 1252	Kontrol	10	1	10.00 ^c	1	10.00 ^c	2 20.00 ^d
	0.5 mM NaCl	15	1	6.66 ^e	2	13.33 ^b	3 20.00 ^d
	0.5 mM NaCl+Ajanlar	33	9	27.27 ^a	2	6.06 ^d	11 33.33 ^b
	1 mM NaCl	21	2	9.52 ^{cd}	6	28.57 ^a	8 38.09 ^a
	1 mM NaCl+Ajanlar	31	7	22.58 ^b	2	6.45 ^d	9 29.03 ^c
	1.5 mM NaCl	8	0	0 ^f	1	12.50 ^b	1 12.50 ^e
	1.5 mM NaCl+Ajanlar	10	1	10.00 ^c	1	10.00 ^c	2 20.00 ^d
	Toplam	172	24	13.95	22	12.72	46 26.74

* Her sütunda ayrı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir (P<0.01)

** Kullanılan her 100 kallus için regenerasyon oranı

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Haploid ve DH'lerin biyoteknolojik çalışmalarda kullanılabilmesi için güvenilir doku kültürü protokollerinin bilinmesi gerekir. Çünkü genotiplerin daha geniş bir yelpazede regenerasyon etkinliklerini iyileştirebilmek için düşük oranlı embriyo oluşumu, albinizm, bitki regenerasyonu gibi birkaç probleminin çözülmesi gerekmektedir. Her ne kadar farklı türler, bir tür içindeki farklı çeşitlerde olduğu gibi, çok çeşitli fiziksel ihtiyaçlar gösterebilirler de ve bitki oluşumu için tek bir standart koşul ya da protokol bulunmasa da, anter kültürü için ortak kurallar konulması mümkündür.

Anter kültüründe embriyogenik cevabı etkileyen birçok içsel ve dışsal faktör vardır (Atanassov et al., 1995; Datta, 2005; Smykal, 2000; Wang et al., 2000). Genotip, donör bitkilerin fizyolojik durumu ve yetiştirme koşulları, mikrospor gelişim safhası, anterlerin ön işlem koşulları, *in vitro* kültür ortamı ve koşulları ve onların birbirleriyle etkileşimleri gibi faktörler *in vitro* kültürde anter cevabını büyük ölçüde etkilemektedir.

Genotip içsel faktörler arasında temel bir rol oynar. Bir türün farklı genotiplerinin anter kültürüne farklı cevaplar verdiği defalarca bildirilmiştir. Ekmeklik buğday (Caswell et al., 2000; Przetakiewicz et al., 2003) ve makarnalık buğday (Bommineni and Jauhar, 1996; Benkirane et al., 2000; Gonzalez et al., 2001) genotipleri arasında ki farklılıkları gösteren birçok rapor vardır. Bunun yanında 21 farklı *Triticum aestivum* genotiplerinin sadece 10 tanesinden haploid doku elde edilirken pirinçte japonika alt türünün indika alt türünden daha verimli olduğu tespit edilmiştir (Bajaj, 1990). Bu çalışmada da 4 durum buğdayı genotipinin anter kültürü yetenekleri araştırılmıştır. Her 4 çeşitte de anter cevabı ve kallus üretimi gözlenmekle beraber önemli genotipik farklılıklar olduğu belirlenmiştir. “Kundur 1149” çeşidi % 75.92 anter cevabı ve % 22.50 kallus oluşumu ile en yüksek ($P<0.01$), “Mirzabey 2000” ise en düşük anter cevabı ve kallus oluşumu gösteren çeşit olmuştur (Çizelge 4.2.). Rashid vd. (2002) durum buğdayında farklı genotiplerin farklı kallus oluşum ve regenerasyon cevabı gösterdiğini vurgulamıştır. Gonzalez vd. (2001) kallus oluşum

sıklığının % 54-100 arasında değişim gösterdiğini rapor etmişlerdir. He et al. (1998) ise durum buğdayında bu sıklığın % 44-89 arasında değiştiğini belirtmişlerdir. Bommineni and Jauhar (1996) ise çok daha yüksek değerler kaydetmişlerdir. Fakat bahsedilen çalışmalarda kallus oluşum sıklığının bu kadar yüksek olmasının sebebi denemede bitkinin somatik dokusunun kullanılmasıdır. Durum buğdayı ile yapılan gametofitik çalışmalarda ise kallus üretimi çok daha düşük olmaktadır. Örneğin, J'Aiti vd. (1999) test ettikleri 18 makarnalık buğday genotipinin 5 tanesinin anter kültüründe başarısız olduğunu diğer genotiplerinde tekniğe çeşitli oranlarda cevap verdiğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada ise makarnalık buğday genotiplerinin kallus oluşum sıklığı % 13.32-22.50 arasında değişiklik göstermiştir (Çizelge 4.2.). Buğdayda anter kültür cevabının hem çekirdek hem de sitoplazmik kontrol altında olduğu gözlenmiştir (Doğramacı-Altuntepe vd., 2001). Halbuki varyasyonların çoğunluğuna çekirdek genlerinin neden olduğu rapor edilmiştir (Ekiz ve Konzak, 1991).

Foroughi-Wehr vd., (1982) kallus oluşumu, kallus stabilizasyonu, bitki regenerasyonu ve yeşil bitki oluşumuna karşı albinolar olarak adlandırılan dört bağımsız ve farklı kalıtsal özelliğin ayrımını yapmıştır. Anterlerin embriyo üretim oranı ve anter başına üretilen regene bitki sayısının bağımsız olarak belirlenebileceği görülmüştür (Dunwell, 2010).

Bu çalışmada en iyi regenerasyon ve yeşil regenerant (kalluslardan üretilen klorofilli bölgeler taşıyan regenerantlar) oranı “Kızıltan 91” çeşidinde meydana gelmiştir (Çizelge 4.2.). Bunun yanında anter kültürü yapılan “Kızıltan 91” ve “Ç 1252” makarnalık buğday çeşitleri birbirine yakın oranda kallus oluştururken bir sonraki adımda ürettikleri regenerantlar arasında büyük farklılıklar olduğu görülmüştür ($P<0.01$) (Çizelge 4.2.). “Kızıltan 91” çeşidinin regenerasyon oranı % 29.67 iken “Ç 1252” çeşidinde bu oran % 18.53 olarak bulunmuştur. Kallus oluşum oranı ve regenerasyon kapasitesinin bu bağımsız doğası bu özellikleri kontrol eden farklı genetik bileşenlerin var olduğu hipotezini desteklemektedir. Bu özellik daha önce makarnalık buğday (Bohorova et al., 2001) ve ekmeklik buğday (Chowdhury et al., 1991; Özgen et al., 1998) için rapor edilmiştir.

Bu çalışmada kültüre alınan 3375 anterden elde edilen yeşil regenerant oranı % 16.63 iken albino oranı % 11.95 kadardır. Önceki çalışmalar tahıl bitkilerinin anter kültüründen yeşil bitki üretiminin bazı sitoplazmik faktörler yanında kompleks genetik faktörler altında olduğunu göstermektedir (Ekiz ve Konzak, 1991). Örneğin arpa albino bitkileri olgun kloroplast içermemekte ve mikrospor kaynaklı pirinç albino bitkilerinde büyük ölçekli bir plastit delesyonu olmaktadır (Jahne ve Lörz, 1995). Durum buğdayında yeşil haploid bitki üretimi için çekirdek ve sitoplazmik genlerin her ikisine de ihtiyaç duyulduğu varsayılabilir. Mikrosporların plastit genomlarının olmamasının veya yetersiz olmasının durum buğdayında haploid albino bitkilerin gelişimine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Kültürü yapılan mikrosporların çekirdek genlerine eksiksiz sahip olacakları düşünülse de onlarla etkileşimde olan sitoplazmik faktörlere her zaman sahip olunmayabilir ve bu yüzden albinolar meydana gelebilir. Bu hipotez durum buğdayı x mısır melezlenmesinde sadece yeşil haploidlerin üretilmesi ile desteklenmiştir. Üretilen haploid bitkiler muhtemelen dişi durum ebeveynin tüm genetik materyaline (plasmon) sahiptir (Almouslem vd., 1998). Bu hipotez yumurtalık kültürü ile haploid bitkilerin üretilebileceğini doğrulamaktadır. Eğer yeşil bitki üretimi için sitoplazmik faktörler gerekli ise sonra ginogenetik haploidler yeşil olacaktır.

Çizelge 4.2.'den de görülebileceği gibi çalışmamızda % 16.63 kallus regenerasyon ortamında klorofil geliştirmiştir. Böylece genel olarak 1.39 olarak bulunan yeşil/albino regenerasyon oranı cesaret vericidir. Bununla beraber albinoluğun yaygın oluşumunu açıklamak zordur. Bazı çalışmalarda donör bitkilerin yetiştirilme koşullarının bu durumu oldukça etkilediği görülmüştür. Klorofil gelişimi için gen ifadesi anter-donör bitkilerin büyüme koşulları gibi çevresel faktörlerden etkilenmektedir. Tarlada yetiştirilen donör bitkilerin muhtemelen anterlerinde daha fazla protoplast bulunduğundan daha fazla yeşil bitki ürettikleri bulunmuştur (Doğramacı-Altuntepe vd., 2001). Quyang (1986), mikrosporlardan embriyo oluşum oranının tarlada yetişen kışlık buğdayda serada yetişen bitkilerden önemli derecede yüksek olduğunu; yeşil bitki regenerasyonunun da serada yetişenlere göre birkaç kat daha fazla olduğunu bildirmiştir. Tarladan alınan bitkilerin bu avantajının yanında,

çevre şartlarının çeşitliliğinden dolayı *in vitro* çalışmalar esnasında oluşabilen kontaminasyon vb. problemler ve materyal olarak kullanılan buğday bitkilerinin sadece belirli bir dönemde toplanabilmesi gibi dezavantajları da vardır. Bu yüzden bu çalışmada donör bitkiler kontrollü koşullarda bitki büyüme kabini içinde yetiştirilmiştir.

Ortam içeriği ve kültür koşulları da albino bitki üretimini etkileyen faktörlerdendir. Laktik asit ya da kültür esnasında üretilen diğer organik ya da metabolik bileşenlerin birikimi primordial hücre organellerine zarar verebilmekte ve bu durum albino bitki üretimi ile sonuçlanabilmektedir (Kao, 1981). Ortamın kimyasal kompozisyonu kültür koşulları ile birleştiğinde klorofil gelişimini kontrol eden gen ya da genlerde mutasyona neden olabilmektedir (Doğramacı-Altuntepe, 2001).

Bu çalışmada makarnalık buğday genotiplerinin orta veya geç tek çekirdekli veya polen mitozuna yakın olan mikrosporları bulunduran anterleri kullanılmıştır. Çünkü mikrosporların gelişim safhası anter kültürünün başarısını güçlü biçimde etkileyen kompleks bir faktördür. Embriyogenik yeteneğin gelişimi test edilen türlere bağlı olarak farklılık göstermektedir fakat genellikle ilk polen mitozu esnasında indükleyici uygulamalara duyarlılık oldukça önemlidir (Malik vd., 2007). Polen taneleri depo maddeleri biriktirmeye başladıktan sonra genellikle embriyogenik kapasitelerini kaybetmeye başlamakta ve gametofitik gelişim yoluna doğru eğilim göstermektedirler (Heberle-Bors, 1989; Raghavan, 1990). Buğday da ve çoğu bitkide anterlerin mikrosporlar erken ya da geç tek çekirdekli safhada iken kültüre alınmasının androgenik cevabın kalitesini artıracak bir çok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Datta et al., 2005; Kondic-Šipka et al., 2007). Bununla beraber geç tek ya da erken iki çekirdekli mikrosporları içeren mısır anterlerinin kültüre çok iyi cevap verdiği bulunmuştur (Gaillard et al., 1991). Telmer vd. (1992) *Brassica napus*'ta oluşum için en iyi safhanın ilk polen mitozu esnasında mikrosporlar geç tek çekirdekli ya da erken iki hücreli polen tanesi durumunda iken olduğunu rapor etmişlerdir. Sopory ve Munshi (1996) mikrospor safhasının anter kültürü ile üretilen bitkinin ploidi seviyesini etkileyeceğini belirtmişlerdir. Çünkü çalışmalarında tek çekirdekli safhada bulunan mikrospondan elde ettikleri bitkilerin çoğunlukla haploid

olduğunu, bunun aksine daha geç safhada bulunan mikrosporları içeren anterlerle ürettikleri bitkilerin yüksek kromozom sayısına sahip olduğunu gözlemişlerdir.

Azot-açlığı bulunan bitkilerin anter kültürüne daha iyi cevaplar verdiği belirtilmiştir. Bu sebeple bu çalışmanın ilk iki tekerrüründe normal ekim zamanında yetiştirilen bitkilere suni gübre verilmemiştir. Ancak çalışmanın son tekrarında yetiştirilen donör bitkilere ortalama 30 günde bir suni gübre (N : P : K) takviyesi yapılmak durumunda kalınmıştır. Bununla beraber suni gübre verilmeyen bitkilerden alınan anterlerin kültüre daha iyi cevap verdiği görülmüştür. Donör bitkilerin P-taneleri sayısını (Heberle-Bors, 1985) etkileyen fizyolojik koşullar, hormonların içsel seviyeleri ve anter dokusunun besinsel durumu (Sunderland ve Dunwell, 1977) yöntemin tüm başarısını etkilemektedir. Embriyogenik polen tanelerinin veya P-tanelerinin *in vitro* ve/veya *in vivo* oluşumları, daha ince ekzin yapısı, asetorkarminle zayıf boyama, vakuol varlığı ve nişasta tanelerinin bulunmaması durumlarının nitrojen açlığı olgusuyla bağlantılı olduğu görünmektedir (Heberle-Bors, 1983, 1985, 1989). Anter cevabında önemli mevsimsel değişimler birçok genotipte gözlenmiştir. Vasil (1980) tarla koşullarında büyüyen bitkilerden alınan anterlerin serada yetiştirilen bitkilerden alınan anterlerden daha iyi cevap verdiğini belirtmiştir. Tütünde, ön kültür koşullarının etkisi ilk olarak Dunwell (1981) tarafından araştırılmış ve mikrospor embriyo ve bitki veriminin ışık yoğunluğu ve fotoperiyodundan etkilendiği gösterilmiştir. Bitkilerin nitrojen durumu da mikrospor embriyo verimini büyük ölçüde etkilemektedir (Sunderland, 1978; Tsay, 1981).

Birçok genotipte çiçek tomurcuğuna yapılan fiziksel ve kimyasal ön işlem uygulamalarının, kültür işleminden önce tüm çiçek durumu ya da anterlerin sporofitik yola eğilimi için bir tetikleyici olduğu ve böylece fertil polenin gelişimini engellediği (gametofitik yol) belirtilmiştir. Soğuk, yüksek sıcaklık, yüksek nem, su stresi, anaerobik uygulama, sükröz ve nitrojen açlığı, santrifüjleme, etanol, mikrotubul dağıtıcı ajanlar, c-ışınlama, elektrostimülasyon, yüksek ortam pH'ı, ağır metal uygulamaları anter ve mikrospor kültürlerinde yaygın olarak kullanılan ön işlemler olarak belirtilmiştir. Ayrıca Shariatpanahi vd. (2006) bunları genellikle

yaygın kullanılan, az kullanılan ve yeni ortaya çıkan olmak üzere 3 kategoride sınıflandırmışlardır.

Bu çalışmada, daha önce yapılan çalışmalara paralel olarak başaklara +4°C’de 7 gün yapılan soğuk ön işlemin anter cevabı ve kallus oluşumunu önemli derecede arttırdığı belirlenmiştir. Çizelge 4.3.’ten de görülebileceği gibi kallus oluşumundaki artış en fazla % 17.28 ile “Kunduru 1149” çeşidinde meydana gelmiştir. Sıcaklık şoku polen embriyogenezis gelişiminde en etkili uygulama olarak düşünülmektedir. Optimum sıcaklık ve ön işlem süresi genotipler arasında çeşitlilik göstermektedir. Örneğin 3 tane kolza çeşidi (“Tower”, “Willi” ve “Duplo”) arasında en yüksek verim (kültür edilen anter başına 1.1 embriyo) 35°C’de 3 gün ön işleme maruz bırakılan “Duplo”da meydana gelmiştir (Dunwell et al., 1983). Birçok tahılın anter kültüründe soğuk ön işlem (+4°C’de 2-3 hafta) rutin olarak uygulanmaktadır ve ayrıca bunun etkisini genotipe bağlı olduğu bulunmuştur (Powell, 1988; Osolnik et al., 1993). Durum buğdayında +4°C’de yapılan soğuk ön işlemin embriyogenesis oluşumu ve embriyo gelişimini önemli derecede teşvik ettiği gösterilmiştir (Labrani et al., 2005; Ayed et al., 2010). Soğuk ön işlemin bu olumlu etkisi ekmeklik buğdayda Ohnoutková vd. (2000) tarafından da gösterilmiştir. Özkum vd. (2000) anterlerde bulunan ve embriyo oluşumunu engelleyebileceği ileri sürülen absisik asidin soğuk uygulamaları ile etkisini azaltmayı amaçlayarak yaptıkları çalışmada, gerçekten de soğuk uygulamalarının anterlerdeki absisik asit miktarını azaltıcı etki yaptığını ortaya koymuşlardır. Duncan ve Heberle (1976) soğuk ön işlemin anter dokularında bozulma işlemlerini yavaşlattığını ve böylece mikrosporları bozulan anterlerden serbest kalan zehirli maddelerden koruduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca soğuk ön işlem uygulamasının bazı genotiplerde yeşil bitki regenerasyon kapasitesini iyileştirdiğini rapor etmişlerdir. Bu çalışmada ise toplam regenerasyon ve yeşil bitki oranlarının 7 günlük ön işlem uygulamasında daha iyi sonuçlar verdiği gözlenmiştir fakat bu sonuçlar istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Aynı şekilde albino üretiminde de 7 günlük soğuk ön işlemde düşüşler meydana gelmiş fakat bunlarda istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Soğuk ön işlem uygulaması ile yeşil regenerant üretiminde ki artış ve albino üretiminde ki azalışın en fazla “Kunduru 1149” çeşidinde olduğu belirlenmiştir. Soğuk ön işlem çoğunlukla mikrosporların

gametofitik yol yerine sporofitik yola yönelimlerini sağlayan bir uygulama olduğundan, bu uygulamanın kallus oluşumu üzerine gösterdiği önemli etkiyi regenerasyon miktarı üzerinde göstermemesinin doğal bir durum olduğu düşünülebilir.

Kültür ortamı kompozisyonu mikrospor embriyogenesis oluşumunda çok önemli bir rol oynamaktadır. Farklı genotipler polen kaynaklı bitki oluşumunda çok farklı bazal ortam ihtiyacı göstermektedir. Anterlerin besin ihtiyacı izole mikrosporlardan çok daha basit karşılanmaktadır (Reinert and Bajaj, 1977; Bajaj, 1990). Anter kültürü için kullanılan en temel ortam N6 ortamı (Chu, 1978), MS ortamı (Murashige and Skoog, 1962), Nitsch ve Nitsch (1969) ortamı ve B5 ortamı (Gamborg et al., 1968) olmakla birlikte bunlarda başka kullanılan birçok ortam vardır. Bunlardan ikisi bu çalışmada da kullanılan 190-2 (Wang and Hu, 1984) ve C17 (Wang and Chen, 1986) sıvı kültür ortamları ile MMS3 (Hu and Kasha, 1997) regenerasyon ortamıdır. Otani ve Shimada (1995) makarnalık ve ekmeklik buğday genotipleri kullanarak yaptıkları anter kültür çalışmasında birkaç kültür ortamı kullanmış ve mikrospor embriyogenesisi için en etkili ortamın C17 olduğunu belirtmişlerdir. C17 kültür ortamı birçok buğday anter kültürü çalışmasında kullanılmıştır (Luckett et al., 1991; Aiti et al., 1999). 190-2 kültür ortamının da anter kültüründe kullanıldığı birçok çalışma bulunmaktadır (Tuveesson and Öhlund, 1993; Pauk et al., 2000; Maluzunski et al., 2003). Anter kültüründe embriyo üretimi ve osmotik ve besinsel etkilerinden dolayı bir karbonhidrat kaynağı gereklidir (Powell, 1990). Karbonhidrat konsantrasyonunun etkisinin muhtemelen başlangıç fazı esnasında osmotik basınç düzenlenmesi ile ilgili olduğu belirtilmiştir (Sunderland and Dunwell 1977; Sangwan and Sangwan-Norreel, 1990). Fakat daha sonra ki kültür döneminde karbon kaynağının yüksek konsantrasyonlarının zararlı olduğu görülmüştür (Keller et al., 1975).

Çalışmamızda 190-2 ve C17 başlangıç kültür ortamlarında literatüre uyularak % 9 oranında sükroz kullanılmıştır. Arpa anter kültüründe sükrozun maltoz ile yer değiştirmesi, başlangıç ortamına genellikle 62 g/l konsantrasyonda ve regenerasyon ortamına bunun yarısı kadar miktarda eklenmesi başarıyı arttırmıştır. Maltoz buğday,

tritikale ve pirinç anter kültür ortamına 60-90 g/l civarında eklenmektedir (Wedzony et al., 2009). Çalışmamızda MMS3 regenerasyon ortamında 90 g/l maltoz kullanılmıştır. Sükroz anter kültüründe genellikle % 2-4 seviyesinde kullanılan en yaygın karbon kaynağıdır (Reinert and Bajaj, 1977). Sükrozun büyüme ortamına belli konsantrasyonların üstünde bir osmotik ajan olarak eklenmesi osmotik stresin başlamasına ve büyümede azalmaya sebep olurken (Mehta et al., 2000; Kim and Kim, 2002) kuru ağırlıkta artışa neden olmaktadır (Kishore and Dange, 1990; Juhasz et al., 1997). Kallus dokusunda kuru ağırlığın artışı prolin ve toplam çözünabilir karbonhidratların kallus dokusunda daha çok birikmesi sebebiyle olmaktadır. Sükroz bir karbon kaynağı olarak embriyogenik kallus kültürü için çok önemlidir. İn vitro embriyogenik kallus gelişimi için kritik bir faktör olan ortam osmolitesini düzenlemektedir. Buna ek olarak, diğer bazı araştırmacılar sükrozun osmotik etkiye neden olan karbon ve enerji görevleri dahil daha birçok görevi olduğunu rapor etmişlerdir (Carrier et al., 1997; Johnson et al., 1997). Üç hücreli durumda iken atılan olgun polen içeren türlerde (Gramineae, Cruciferae gibi) yüksek sükroz miktarına (% 6-17) ihtiyaç duyulurken (Dunwell and Thurling, 1985) iki hücreli olgun polenlerde (Solanaceae gibi) daha düşük seviyelerde (% 2-5) sükroza ihtiyaç duyulmaktadır (Dunwell, 2010). Fruktoz ve glukoz'un Petunia anter kültüründe polen embriyogenezini inhibe ettikleri belirtilmiştir (Raquin, 1983).

Bitki büyüme düzenleyicilerinin anter kültüründeki etkisi üzerine çok sayıda araştırma yapılmıştır. Çünkü ortam kompozisyonu, özellikle hormonal denge *in vitro* kültür oluşumunu ve bitki regenerasyonunu etkileyen önemli bir diğer faktördür (Jiang et al., 1998). Bitki büyüme düzenleyicilerinin (oksin, sitokinin ya da ikisinin kombinasyonu) bitki türlerinin birçoğunda (hatta zor türlerde bile) mikrospondan oluşan embriyo üretimini artırmada kritik bir role sahip oldukları bulunmuştur (Maheshwari et al., 1982).

Bu çalışmada kallus üretilen başlangıç kültür ortamları (190-2 ve C17) 2.0 mg/l NAA ve 1.5 mg/l Kinetin eklenerek hazırlanmıştır. Kallusların daha sonra aktarıldığı MMS3 regenerasyon ortamında ise yine aynı büyüme düzenleyicileri kullanılmış fakat her ikisinin miktarı 0.5 mg/l'ye düşürülmüştür.

Oksin konsantrasyonu ve çeşidi mikrospor gelişim yolunu belirlemede önemlidir (Ball vd., 1993). 2,4-D ile kallus oluşumu, IAA ve NAA ile direkt embriyogenesis teşvik edilmektedir (Armstrong vd., 1987; Liang vd., 1987). Kim ve Baenziger (2005) çeşitli oksin uygulamalarının buğday anter cevabı üzerine olan etkisinin önemli derecede farklı olduğunu belirtmişlerdir. 2,4-D+NAA kombinasyonunun embriyodan çok kallus oluşumunu teşvik ettiğini, IAA'nın embriyo oluşumu ve direkt bitki regenerasyonunu engellediğini rapor etmişlerdir.

Kintzios vd. (1996) yaptıkları çalışmada bitki regenerasyonu için en iyi NAA konsantrasyonunu 1 mg/l olarak bulmuşlardır. Chin ve Scott (1977) ve Ahlowalia (1982) bu özel NAA konsantrasyonunun buğday kallusunun kök oluşumu için optimum miktar olduğunu ileri sürmüşlerdir. Kintzios vd. (1996) 1 mg/l NAA uygulamasının, bitki regenerasyon safhası esnasında, *T. aestivum* ve *T. durum* embriyolarından elde edilen kalluslarda kök oluşum oranını arttırdığını rapor etmiştir. Nasırcılar vd. (2006) 1 mg/l NAA içeren regenerasyon ortamında büyütülen embriyogenik kallusların 1 mg/l 2,4-D içeren ortamda büyütülen kalluslardan daha fazla ve daha hızlı gövde ve yaprak oluşturdıklarını belirtmişlerdir.

Qin vd. (2005) 2,4-D içeren başlangıç kültür ortamının piklorama göre bitki regenerasyonunda daha başarılı olduğunu belirtmişlerdir. Köklenme, bitkiye gidiş, yeşil noktalı regenerasyon ve kallustan bitki regenerasyon sayısının 2,4-D ortamında büyütülen kalluslarda daha yüksek olduğu görülmüştür (Akhtar, 2006). Satyavathi vd. (2004) ise dikambanın durum buğdayı anter kültüründe 2,4-D, GRs ve pikloram ile karşılaştırıldığında kallus oluşumu ve bitki regenerasyonu için en etkili oksin olduğunu belirtmişlerdir. Bu durum Mendoza ve Kaeppler (2002) tarafından da buğdayda olgun embriyo kültürü için yaptıkları çalışma sonucunda bildirilmiştir.

Oksinler somatik embriyogenesiste önemli rol oynamaktadır. Oksinler genellikle 2,4-D (Ahlowalia, 1982; Maddock et al., 1983), dikamba (Papenfuss and Carman, 1987) ve pikloram (Wernicke and Milkowitz, 1987) şeklinde kullanılmakta ve çalışılan bitki türüne bağlı olarak çeşitli etkiler göstermektedirler. Kallus oluşumu

için gerekli olan oksinler, bitki regenerasyonunda negatif rol oynayabilmektedir. Bu yüzden gövde oluşumu için kullanılan kültür ortamında miktarı düşürülmekte ya da ortama hiç eklenmemektedir (Purnhauser et al., 1987).

Bradley vd., (2001) bazı deneysel sonuçlar kallus kültür ortamına düşük konsantrasyonlarda eklenen sitokininlerin genellikle embriyogenik kallus oluşumunu arttırdığını belirtmişlerdir (Benderradji et al., 2007). Buğday anter kültürü ile bitki üretiminde zeatin ve BA'nın diğer sitokininlerden daha iyi sonuçlar verdiği fakat yeşil/albino bitki oranını çok az miktarda değiştirdiği bildirilmiştir (Kim ve Baezinger, 2005). Gibberellinler ve absisik asit bu çalışmalarda kültür ortamına nadiren eklenmektedir (Germana, 2011).

Bu çalışmada da 190-2 ve C17 başlangıç kültür ortamlarına anterlerle birlikte 5-6 adet ovaryum eklenmiştir. Çünkü birçok tahıl türünün anter kültüründe, besin ortamına yumurtalık dokusu eklenmesinin arabinogalaktanların uyarıcı rolü sebebiyle (Letarte et al., 2006) oldukça yararlı olduğu belirtilmiştir (J'Aiti et al., 1999). Başlangıç ortamına 5 ovaryum eklendiğinde, embriyo benzeri yapıların başak başına ortalama miktarı 7.6'dan 50.1'e ve yeşil bitkiler 0.6'dan 8.9'a yükseldiği, bununla beraber 10 ovaryum eklendiğinde ne embriyo benzeri yapıların ne de yeşil bitki üretiminde artış olmadığı belirtilmiştir (Broughton, 2008). pH gametik embriyogenik işlemleri etkileyebilen bir başka faktördür (Stuart et al., 1987). Anter kültüründe ortam pH'si asidiktir ve otoklav işleminden önce genellikle 5.7-5.8'e ayarlanmaktadır. Çalışmamızda 190-2 ve C17 başlangıç kültür ortamlarının ve MMS3 regenerasyon ortamının pH'si 5.8 olacak şekilde ayarlanmıştır.

Yaptığımız çalışmada kallus üretmede kullanılan başlangıç kültür ortamları literatüre uyularak 100 ml kültür ortamı için 10 gr fikel eklenerek hazırlanmıştır. Yine iki haftada bir yapılan yenileme işleminde, fikel ile hazırlanmış sıvı ortam kullanılarak kallus üretimi ve kallusun hacimsel gelişimi desteklenmiştir. Anter kültür ortamı genellikle agar ile katılaştırılmaktadır fakat nişasta (patates, buğday, mısır ve arpa nişastası), gelrite, agaroz ve fikel gibi diğer katılaştırıcı ajanların yararlı etkileri olduğu rapor edilmiştir. Sıvı, yarı-katı ve iki fazlı sistemlerde kültüre alınan anterlerde farklı sonuçlar elde edilmiştir (Dunwell, 2010). İlk anter kültürü

çalışmalarında sıklıkla kullanılan agarın polenden embriyo oluşumu için inhibitör maddeler içerdiği belirlenmiş ve sıvı kültür ortamı tercih edilmeye başlanmıştır. Anter kültür tekniğinde stres, gametofitik gelişimin durdurulması ve mikrosporlarda polen embriyogenesinin başlaması için kritik öneme sahiptir (Touraev et al., 1997). Tahıllarda mikrospordan oluşan yeşil bitkilerin sayısının arttırılmasında kullanılan diğer bir yöntem kültür ortamına fikor eklenmesidir. Bu madde anter ve kallusların su yüzünde kalmasını sağlar (Olsen, 1987; Trottier et al., 1993). Sıvı kültürün bir başka avantajı mikrosporların ortamda serbest durumda olmasıdır. Böylece gelişen embriyolar arasında ki muhtemel rekabet etkileri azaltılmaktadır. Bu embriyoların batması zararlı anaerobik koşullara neden olabilmektedir. Bu sorun ilk olarak Kao (1981) tarafından tanımlanan ve günümüzde anter ve izole edilmiş mikrospor kültür tekniklerinde kullanımı oldukça yaygın olan (Marchand et al., 2008; Cistue' et al., 2009) fikor ile ortadan kaldırılabilir. Başlangıç kültür ortamına fikor eklenmesinin embriyogenesi arttırdığı belirtilmiştir (Redha and Talaat, 2008). Benzer sonuçlar buğdayda Fadel ve Wenzel (1990), arpada Devaux vd. (1993) ve pirinçte Raina ve Irfan (1998) tarafından elde edilmiştir. Fikolün embriyogeneze üzerindeki pozitif etkisi mikrosporların sıvı ortama batmasını engelleyici yüksek moleküler ağırlık kaldırma gücüne sahip bir ajan olmasına bağlanabilir. Bununla beraber fikolün bu pozitif etkisi Zhou vd. (1991) ve Ingram vd. (2000) tarafından yapılan çalışmalarda rapor edilmemiştir. Fikor uygulamasının yeşil bitki üretimini arttırdığı da birçok çalışmada belirtilmiştir (Zhou vd., 1992; Immonen ve Robinson, 2000; Cistue' vd., 2006, 2009).

Bu çalışmada makarnalık buğday bitkileri, 16 saat/gündüz 8 saat/gece fotoperiyodu düzeninde, 12 kilolüks ışık yoğunluğu, 18-20 C° sıcaklık ve % 51-54 nem oranı koşulları altında bitki büyüme kabinde yetiştirilmiştir. Donör bitkinin genotipi son derece elverişli olsa bile, mikrospordan *in vitro* koşullarda haploid embriyo uyarımını başlatabilmek, bu bitkilerin yetiştirildiği koşullara da bağlıdır. Buğday, arpa, çeltik ve çavdar gibi bitkilerde, donör bitkinin yetiştirme koşullarının anter kültüründeki başarı üzerinde çok etkili olduğu bilinmektedir. Foroughi-Wehr ve Wenzel (1993) yaptıkları çalışmada, uygun yetiştirme koşulları sağlanamadığında,

anter kültüründeki başarısı yüksek olan “İgri” buğday çeşidinin bile sadece albino embriyolar oluşturmuş ve tek bir yeşil normal haploid bitki elde edememişlerdir.

Çalışmamızda kültürlerin inkübasyonu 28°C’de, ışısız ortamda yapılmıştır. İnkübasyon sonunda oluşan kalluslar regenerasyon ortamlarına alındıktan sonra 25°C sıcaklıkta 16 saat gündüz fotoperiyodunda regene bitki oluşumu bekletilmişlerdir. Bununla beraber 3 cm’lik petri kaplarına ortalama 3-6 ml kültür ortamı eklenmiş ve her petri kabına ortalama 30-60 anter konulmuştur. Anter kültürleri genellikle 24-28°C sıcaklıkta ve ortalama 2000 lüks ışık yoğunluğunda 14 saat fotoperiyodunda 24 gün inkübe edilmektedir (Reinert ve Bajaj, 1977). Fakat daha farklı kültür koşulları da rapor edilmiştir. Bununla beraber optimum koşulların her bir sistem için belirlenmesi gerekmektedir (Germana, 2011). Buğdayda en uygun inkübasyon sıcaklığının 28-30°C olduğu rapor edilmiştir (Ouyang et al., 1983). Bununla beraber yüksek inkübasyon sıcaklığının tahıllarda albino bitki sayısını arttırdığı belirtilmiştir (Dunwell, 2010). Işık *in vitro* polen morfogenezini düzenleyen çevresel bir sinyaldir (Reynolds ve Crawford 1997). Işık kalitesinin anter kültürü üzerine etkileri ile ilgili olarak yüksek yoğunluktaki beyaz ışığın mikrosporların embriyogenik oluşumunu inhibe ettiği belirtilirken karanlık ya da düşük yoğunluktaki beyaz ışığın daha az zararlı olduğu rapor edilmiştir (Wenzel ve Foroughi-Wehr, 1984; Bjørnstad vd., 1989). Kültür yoğunluğunun (örneğin, ortamın birim hacmindeki anter sayısı) birçok tahıl türünün anter kültüründe büyük öneme sahip olduğu bulunmuştur. Bu etkinin diğer üreme dokuları ve organları ile modifiye edilen kültür ortamlarının kullanımı ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Broughton, 2008; Cistue’ et al., 2009).

Geleneksel yöntemlerde, yılın herhangi bir zamanı istenilen materyalin gelişiminde oluşturulması gerekli çevre için özel bir altyapıya ihtiyaç duyulur. Bu çalışmada makarnalık buğday genotiplerinde anter kültür sisteminin ve bazı organik ve inorganik (prolin ve kalsiyum) tolerans faktörlerinin tuzluluk probleminin çözümünde hızlı ve basit bir metot olarak kullanılabilme olanakları araştırılmıştır. Ayrıca bu çalışmanın diğer orijinal noktası ise tuz ve diğer tolerans faktörlerinin regenerasyon ortamına eklenmesidir. Çünkü, haploid ve kendiliğinden doubled haploid embriyo benzeri kalluslar gametoklonal çalışmalarda alınabilmekte ve

haploid ya da doubled haploid bitkiler üretilebilmektedir. Bunlarda verim ve diğer kantitatif özellikler açısından daha kolay ve hızlı olarak değerlendirilebilmektedir.

Tuzluluk bitki gelişimi ve tahıl verimliliğini sınırlayan temel bir faktör olarak bilinmektedir. Tuzluluk toleransı tarla koşulları altında klasik biyoteknolojik yöntemlerle seçilimi oldukça zor olan bir özelliktir (Richards, 1996). Tuza toleranslı hücrelerin *in vitro* seçiliminden sonra tuz toleransının gelişmesiyle birlikte bitki regenerasyonunu ya da tuza toleranslı transgenik bitkilerin üretilmesi gibi alternatif yöntemler de vardır (Bohnert and Jensen 1996, Wincov, 1996). Araştırmalar bazı tahıllarda tuza toleranslı hatların tuzlu olmayan koşullar altında anter kültür tekniği aracılığıyla başarılı bir biçimde seçilebildiğini göstermiştir (Zapata et al., 1991; Miha et al., 1996).

Doku kültür sisteminde tuz stresinin bitki büyümesi üzerine etkisi hakkında yapılan birçok çalışma vardır. Çünkü agar ortamında tuz toleransının anter kültür sistemi ile seçilimi mikrospor seviyesinde mümkündür. Farrukh (2004) tuzluluk stresinin büyüme üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla “LU-26” ve “Potohar” buğday çeşitlerinin bir aylık kalluslarını çeşitli tuz konsantrasyonları içeren MS ortamına almışlar ve artan tuz konsantrasyonları altında büyüme oranının düştüğünü bulmuşlardır. Potahor çeşidi kalluslarında “LU-26” çeşidine göre daha büyük büyüme oranı düşüşü görülmüştür.

Doku kültürü bitkilerin hücre süspansiyonu ya da kalluslarının stres tolerans yeteneğini arttırabilmektedir. Böylece doku kültür tekniği ile seçim daha kolay hale getirilmektedir (Nabors and Dykes, 1985). Regenerasyon ortamına 50, 100, 150 ve 200 mM konsantrasyonda eklenen NaCl kallus ve regenerasyon oranlarını, artan tuz konsantrasyonlarına paralel olacak şekilde düşürmüştür. Yüksek konsantrasyonlarda NaCl içeren ortamlara kontrol ortamından aktarılan kalluslarda nekrozun belirtisi olan kararma ve kahverengileşme görülmüştür. Bununla beraber kallusun bazı kısımları büyümeye devam etmiştir. Bu tuza toleranslı kallus hatları daha sonraki kültürlerde büyümeye devam etmişlerdir.

Bununla beraber çalışmamızda özellikle yüksek NaCl konsantrasyonlarının bulunduğu regenerasyon ortamlarında (1 ve 1.5 mM NaCl) NaCl'nin kalluslar üzerine olan olumsuz etkisi açık bir biçimde gözlenmiştir. NaCl ortamında büyüyen kalluslarda 2-3 hafta sonra kallusun bazı bölgelerinde nekroz belirtileri ve kahverengileşme görülmeye başlamıştır (Şekil 4.7.a). Kallusun yeşil bölgelerinde regenerasyon meydana gelmesine rağmen oluşan yeşil regenerantların morfolojik yapısında anormallikler gözlenmiştir (Şekil 4.7.e-f). Bu ortamlardaki kalluslar kontrol gurubunda bulunan kalluslara göre yavaş büyümüş ve her birinin 1-2 genç kıvrımlı yaprağı oluşmuştur. Kök oluşumu meydana gelse de kültür zamanı ilerledikçe gelişmesine devam edememiş ya da canlılığını yitirmiştir. Yinede meydana gelen regenerantlar genotiplerin tuzlu ortamlardaki regenerasyon yetenekleri ile ilgili gözlem yapmamıza olanak sağlamıştır.

Akhtar (2006) tuzluluk uygulamalarının kallustan bitki oluşum yeteneğini derece derece azalttığını bildirmiştir. Bitki regenerasyonunun 8000 ve 12000 ppm NaCl konsantrasyonlarında bitki regenerasyonunu kontrol gurubuna göre % 31.40 ve % 41.70 oranlarında önemli derecede düşürdüğünü belirtmiştir. Bu çalışmada da benzer olarak artan NaCl konsantrasyonlarında neredeyse tüm genotiplerin regenerasyon yeteneği kademeli olarak azalmıştır. Tüm genotiplerde regenerasyon miktarında ki düşüş en fazla 1.5 mM NaCl uygulamasında görülmüştür. Abdel-Hady (2006) tuzluluğun etkilerini test ettikleri tüm genotiplerde ve onların hibritlerinde kallus büyümesini önemli derecede azalttığını belirtmişlerdir. Bunun yanında genotip ve hibritlerin yüksek tuzluluğa farklı derecelerde cevap verdiği ve buna kallusun genetik yapısının sebep olduğunu iddia edilmiştir. Benzer sonuçlar Rashed (1989), El-Hennawy (1996) ve Abdel-Hafez vd. (1999) tarafından da rapor edilmiştir. Yaptığımız çalışmada da genotipler NaCl'ya birbirinden farklı derecelerde cevap vermiştir. Toplam regenerasyon ve yeşil regenerant üretimi açısından bakıldığında "Kunduru 1149" çeşidinin NaCl'den en fazla etkilenen çeşit olduğu görülmüştür (Çizelge 4.10.). Çizelge 4.11.'de de görüldüğü gibi yeşil regenerant üretiminde NaCl'dan en az etkilenen çeşit ise "Mirzabey 2000" olarak bulunmuştur. Genotiplerde düşük tuz konsantrasyonunun genellikle albino oluşumunu kontrol gurubuna göre düşürdüğü fakat daha yüksek tuz konsantrasyonlarında bu miktarın

arttığı görülmüştür (Çizelge 4.10.-4.12.). Bu durum yalnızca “Mirzabey 2000” çeşidinde daha farklı olmuş, 1.5 mM NaCl uygulamasında albino sayısında önemli oranda düşüş meydana gelmiştir (Çizelge 4.11.). “Mirzabey 2000”nin NaCl koşullarında toplam regenerasyon ve yeşil regenerant sayısındaki olumlu tepkileri de göz önüne alındığında bu çeşidin tuz stresine maruz ortamlara daha uygun bir çeşit olduğu düşünülebilir. Çünkü stres koşullarında albino miktarının arttığını gösteren birçok rapor vardır (Ziegler et al., 1990; Kao, 1991; Bavrina et al., 2002). Bu sonuçlar regenerasyon özelliğinin *in vitro* tuzluluğun genotipler üzerindeki etkisini değerlendirmede kallus büyümesinden daha gerekli bir parametre olduğunu yansıtmaktadır.

Collin vd. (1990) ve Abdel-Hady vd. (2001)’de buğdayda bitki regenerasyonunun yüksek seviyelerde NaCl’de büyütülen eksplantlarda büyük ölçüde engellendiğini göstermişlerdir. Gonzalez vd. (2001) yine NaCl’nin bitki regenerasyonunu inhibe ettiğini belirtmişlerdir. Domateste kallus oluşumu, hücre seviyesinde tuz cevabının değerlendirilmesi için kullanıldığında, hücresel ve bütün bitki seviyesinde tuz cevabı arasındaki pozitif korelasyon olduğu bulunmuştur (Rus et al., 1999). Yine Rus et al. (2000) tuzlu ortamda bulunan kallusların kısmi su içeriği ve büyüme oranında kontrole göre bir azalma olduğunu rapor etmişlerdir.

Kalsiyumun tuz stresine karşı koruyucu bir rol oynadığını çeşitli mekanizmalarla açıklamaya çalışan araştırmacıların ortak düşünceleri; hücre zarını koruduğu, iyon alınması ve taşınmasını etkilediği yönündedir. Ca^{+2} ’nın hücre zarındaki negatif yüklü temel gruplarla çapraz bağlantı yaptığı ve bu suretle hücre zarının yapısal bütünlüğünü koruduğu yapılan açıklamalarda yer almaktadır (Doğan vd., 2009).

Çalışmamızda NaCl’nin neden olduğu kalluslarda oluşan nekrozlu bölgeler ve bunların dışında yeşil olan bölgelerden meydana gelen regenerasyon üzerine Ca^{+2} ’nın iyileştirici etkisi araştırılmıştır. Regenerasyon ortamına çeşitli NaCl konsantrasyonları ile eklenen 1 mM miktarındaki Ca^{+2} toplam regenerasyon ve yeşil regenerant miktarlarını çeşitli oranlarda arttırmıştır (Çizelge 4.4.). Çeşitli NaCl konsantrasyonları x kalsiyum kombinasyonun bulunduğu regenerasyon ortamına

alınan kalluslardan oluşan regenerant sayısı en yüksek % 38.46 oranında “Mirzabey 2000” çeşidinde meydana gelmiştir (Çizelge 4.5.). Kalsiyumun var olduğu ortamda yeşil regenerant üretiminde de “Mirzabey 2000” çeşidinin diğer genotiplerden üstün olduğu görülmüştür. En iyi toplam regenerasyon oranı “Kızıltan 91” ve “Ç 1252” çeşitlerinde 0.5 mM NaCl+Ca ortamında meydana gelirken, “Kundurur 1149” ve “Mirzabey 2000” çeşitlerinde 1 mM NaCl+Ca ortamında meydana gelmiştir (Çizelge 4.5.). Yeşil regenerant üretimi ve yeşil/albino regenerant oranlarında ise diğer çeşitler 0.5 ve 1 mM NaCl+Ca ortamlarında en yüksek sonucu verirken, “Mirzabey 2000” çeşidinde ise bu oranların en iyi 1.5 mM NaCl+Ca ortamında olduğu görülmüştür (Çizelge 4.5.).

Bu sonuçlar MMS3 regenerasyon ortamında 440 mg/l CaCl_2 şeklinde var olan ve daha sonra ek olarak verdiğimiz 1 mM kalsiyumun “Mirzabey 2000” çeşidinde tuz stresine toleransta daha etkili olduğunu düşündürmektedir. Rossignol vd. (1977)’de hücre duvarındaki kalsiyum miktarının 1-10 mM arasında olduğunu, hücredeki toplam kalsiyumun % 60 kadarını oluşturduğunu ve sonuçta dış kalsiyum miktarının değiştirilmesi ile kallus dokusunun etkilenmesinin doğal bir sonuç olduğunu bildirmişlerdir (Etienne et al., 1997). *Hevea brasiliensis* kalluslarında yüksek CaCl_2 konsantrasyonunun (9-12 mM) embriyogenik potansiyelin devamı için en etkili kültür ortamı modifikasyonu olduğu rapor edilmiştir (Montoro et al., 1993). Ayrıca kalsiyumun spesifik rolü de gösterilmiştir. Uzun süreli kültürlerin regenerasyon ve çoğalma kapasitelerinin 3 mM CaCl_2 içeren ortamda kallus kalitesi ve somatik embriyo üretim sayısı açısından yetersiz olduğu belirtilmiştir (Etienne et al., 1997).

Prolin birikiminin radikal tutucu gibi davranarak tuz ve kuraklık stresine adaptasyonu geliştirdiği bilinmektedir (Chen and Dickman, 2005). Prolin içeriği strese maruz bırakılmış kalluslarda bırakılmayanlardan daha farklıdır. Prolinin tuza toleranslı genotiplerde daha fazla biriktiği ve buğdayda tuz zararını algılayıcı olarak kullanılabileceği belirtilmiştir. Prolinin bu özelliği tuza tolerans için seçimde yararlı olabilmekte ve tuza toleranslı bitkileri için bir belirleyici olarak kullanılabilmektedir. Shen ve Shen (1992) yüksek NaCl konsantrasyonlarında toplam amino asit miktarı içerisinde serbest prolin oranının arpa fidelerinde önemli derecede arttığını

gözlemişlerdir. Buna benzer sonuçlar Parida vd. (2007) tarafından mısır bitkisinde de gösterilmiştir. Serbest prolinin tuzluluk etkisinin değerlendirilmesinde iyi bir özellik olduğu birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Gangopadhyay ve Basu, 2000; Abdel-Hady vd.,2001). Zebarjadi vd. (2010) prolin birikiminin kallus dokusunun hücresel seviyede osmotik potansiyelinde bir düşüşe sebep olduğunu ve bitkilerin stres ortamında büyümelerini devam ettirebildiğini rapor etmişlerdir. Kültür ortamına dışarıdan verilen prolinin hücre içi serbest prolin miktarını iyileştirdiği belirtilmiştir. Kültür ortamına dışarıdan 2.5, 5 ve 10 mM konsantrasyonlarda eklenen prolin ile bu ortamlarda büyütülen kallusların içsel prolin miktarının, kontrol ortamında bulunan kalluslardan oldukça yüksek olduğu belirtilmiştir (Gerdakaneh vd., 2010). Nitekim bu çalışmada çeşitli NaCl konsantrasyonlarının bulunduğu ortama 2 mg/l miktarında eklenen prolinin toplam regenerasyon ve yeşil regenerant miktarlarını çeşitli oranlarda arttırdığı belirlenmiştir (Çizelge 4.6.). Bu durumda kalluslarda NaCl'nin sebep olduğu yaşlanma ve buna bağlı olarak regenerasyon yeteneğinde meydana gelen azalmaların prolin etkisi ile iyileştirildiği düşünülmektedir.

NaCl konsantrasyonları x prolin kombinasyonun ile oluşturulan regenerasyon ortamlarına aktarılan kalluslardan oluşan regenerant sayısı en yüksek % 34.04 oranında “Kızıltan 91” çeşidinde meydana gelmiştir (Çizelge 4.6.). Prolin eklenen ortamlarda “Kızıltan 91” ve “Mirzabey 2000” çeşitlerinin diğer genotiplerden daha fazla yeşil regenerant ürettiği görülmüştür. Çizelge 4.7.’den de görülebileceği gibi “Kunduru 1149” ve “Ç 1252” çeşitlerinde en iyi toplam regenerasyon oranı 0.5 mM NaCl+prolin ortamında meydana gelirken, “Kızıltan 91” çeşidinde 1 mM NaCl+prolin ortamında meydana gelmiştir. “Mirzabey 2000” çeşidinde ise 0.5 ve 1 mM NaCl+prolin ortamlarında eşit oranda regenerasyon meydana gelmiştir. “Kunduru 1149” ve “Ç 1252” çeşitlerinde 1.5 mM NaCl+prolin ortamında meydana gelen yeşil regenerant oranının “Kızıltan 91” ve “Mirzabey 2000” çeşitlerine nazaran önemli derecede düşük olduğu görülmüştür (Şekil 4.8.). “Ç 1252” çeşidinde 0.5 mM NaCl+prolin ortamında yeşil/albino regenerant miktarı oldukça yüksek olmasına rağmen daha yüksek seviyeli tuz koşullarında (1.5 mM NaCl+prolin) “Kızıltan 91” çeşidinde bu oranın diğer genotiplere göre önemli derecede yüksek olduğu

bulunmuştur (Çizelge 4.7.). Tüm bu sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda prolinin kalluslarda NaCl'nın sebep olduğu nekrozun iyileştirilmesinde ve yeşil bölgeyi regenerant miktarının artırılmasında "Kızıltan 91" ve "Mirzabey 2000" çeşitlerinde daha etkin olduğu söylenebilir.

Diğer araştırmacılar tarafından rapor edilen sonuçlar daha farklıdır. Shevyakova et al. (1998) prolin içeriği ile tuz toleransı arasında bir ilişki bulamamıştır. Gupta and Srivastava (1990) tuz ve kuraklık stresi altında, yaprak alanının yanı sıra prolin içeriğinde dirençli genotipte duyarlı olan genotipten daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Fakat diğer bazı sonuçlar prolin birikiminin tuz direnci ile bir bağlantısının olmadığını göstermiştir. Lacerda et al. (2005) tuz stresi esnasında yapraklarda yüksek miktarda prolin birikiminin tuz toleransı ile ilişkili olmadığı sonucuna varmışlardır.

Sonuç olarak; "Kızıltan 91", "Kunduru 1149", "Mirzabey 2000" ve "Ç 1252" makarnalık buğday çeşitlerinin saksılara ekimleri yapılarak bitki yetiştirme odasında uygun ısı ve ışık koşullarında yetiştirilmiştir. Toplanan başakların yüzey sterilizasyonları yapılmış ve +4°C sıcaklıkta soğuk ön işleme maruz bırakılmıştır. Soğuk ön işlemiden alınan başaklardaki anterler kontrol edilmiş ve tek çekirdekli mikrosporları içeren anterler 190-2 ve C17 başlangıç ortamlarına alınmıştır. Çalışmamızda değerlendirmeye aldığımız anter sayısı 3375'tir. Bu anterlerin % 69.62'si kültüre pozitif cevap vermiş ve % 18.34 oranında kallus oluşturmuştur (Çizelge 4.2.). "Kunduru 1149" çeşidi % 22.50 kallus oluşumu ile genotipler arasında en iyi sonucu vermiştir (Çizelge 4.2.). MMS3 regenerasyon ortamında kontrol gurubu ve tüm uygulamalar birlikte değerlendirildiğinde genotiplerde en yüksek regenerasyonun % 29.67 ile "Kızıltan 91" çeşidinde olduğu görülmüştür. En yüksek yeşil regenerant üretimi yine "Kızıltan 91" çeşidinde % 18.13 oranında meydana gelmiştir. Albino üretimi en yüksek "Ç 1252" çeşidinde % 12.79 oranında, en düşük albino üretimi ise (% 11.39) "Kunduru 1149"da meydana gelmiştir (Çizelge 4.2.).

Regenerasyon ortamına farklı konsantrasyonlarda eklenen NaCl (0.5, 1 ve 1.5 mM) genotip kalluslarında nekroza ve gelişim bozukluklarına sebep olarak regenerasyon oluşumunu çeşitli derecelerde düşürmüştür. Yine ortamda ki NaCl'ye ilave olarak verilen kalsiyum ve prolin çoğu genotip ve uygulamada regenerasyon miktarını, NaCl'nin olumsuz etkisini çeşitli derecelerde iyileştirerek arttırmıştır. Bu amaçla çalışmamızda kalsiyum ve prolin “ajanlar” olarak adlandırılmış ve iki maddenin regenerasyon miktarı üzerine olan etkisi beraber değerlendirilmiştir. NaCl+Ajanlar uygulamasında % 18.62 yeşil ve % 11.95 albino olmak üzere toplam % 30.57 oranında regenerant elde edilmiştir (Çizelge 4.8.). Bu uygulamalarda en iyi sonuçları “Kızıltan 91” ve “Mirzabey 2000” çeşitleri vermiştir. Aynı zamanda bu iki maddenin etkileri tek tek değerlendirilmiştir. NaCl+kalsiyum uygulamasında % 22.59 yeşil ve % 10.87 albino olmak üzere toplamda % 33.47 regenerant meydana gelmiştir (Çizelge 4.4.). Kalsiyum uygulamasında en iyi sonucu “Mirzabey 2000” çeşidi göstermiştir (Şekil 4.5.). NaCl+prolin uygulamasında ise % 13.77 yeşil ve % 13.26 albino olmak üzere toplam % 27.04 oranında regenerant elde edilmiştir (Çizelge 4.6.). Bu uygulamada da en iyi sonuçlar “Kızıltan 91” ve “Mirzabey 2000” çeşitlerinde meydana gelmiştir. Bununla beraber NaCl'nin regenerasyon miktarı üzerindeki sebep olduğu olumsuz durumun iyileştirilmesinde yani kallusların yeşil bölgelerinin korunması ve bu bölgelerden oluşan olumsuz etkisinin giderilmesinde kalsiyumun proline göre daha etkili olduğu görülmüştür. Bunun sebebi olarak kalsiyumun sodyum antagonisti olması ve tuza toleransta sodyumun alınımını sınırlamada direkt etkisinin olması gösterilebilir. Prolinin bitkide birikerek tuz stresine toleransta osmotik olarak, kalsiyumun ise iyonik olarak etkin olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada kalsiyum uygulamasından elde edilen yeşil regenerant sayısı da kalsiyumun proline karşı olan bu üstünlüğünü desteklemektedir.

6. KAYNAKLAR

- Abdel-Hady, M.S., Fahmy, K.H., Hassan, A.H.M., 2001. Wheat genotypic and somaclonal variation in relation with *in vitro* selection for salt tolerance. Egyptian Journal Applied Science, 16 (3), 68-93.
- Abdel- Hafez, A.G., El Hity, M.A., Mohamed, A.A.E, Hamad, T.H., 1999. Dihaploid production and its exploitation in selection for salinity tolerance in bread wheat. 2-Screening for salinity tolerance. First International Tissue Culture Conference and its Application, Egypt.
- Abdel-Hardy, M.S., 2006. *In Vitro* prediction for salt tolerance in wheat. The 2nd International Conference on Water Resources and Arid Environment. King Saud University, Riyadh, Saudi Arabia.
- Ahcar, P.N., 2002. A study of factors affecting embryo yields from anther culture of cabbage. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 69, 183-188.
- Ahloowalia, B.S., 1982. Plant regeneration from callus cultures in wheat. Crop Science. 22, 405-410.
- Ahmad, M.S.A., Javed, F., Ashraf, M., 2007. Iso-osmotic effect of NaCl and PEG on growth, cations and free proline accumulation in callus tissue of two indica rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. Plant Growth Regulation, 53, 53-63.
- ANONİM, 2008. <http://www.fao.org>. Erişim Tarihi: 15.02.2011.
- Akhtar, N., 2006. Callogenesis and organogenesis response of wheat cultivars under sodium chloride salt stress. Pakistan Journal of Biological Sciences, 9 (11), 2092-2096.
- Akkeçeci, Ş., 2001. Bazı ekmeklik (*Triticum aestivum* L.) çeşitlerinin kallus kültüründe tuza (NaCl) toleranslarının belirlenmesi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 49s.
- Anil, V.S., Rao, K.S., 2000. Calcium-mediated signaling during sandalwood somatic embryogenesis. Role for exogenous calcium as second messenger. Plant Physiology, 123, 1301-1311.
- Almouslem, A.B., Jauhar, P.P., Peterson, T.S., Bommineni, V.R., Rao, M.B., 1998. Haploid durum wheat production via hybridization with maize. Crop Science, 38 (4), 1080-1087.
- Armstrong, T.A., Metz, S.G., Mascia, P.N., 1987. Two regeneration system for the production of haploid plants from wheat anther culture. Plant Science, 51, 231-237.

- Arruda, S.C.C., Souza, G.M., Almeida, M., Gonçalves, A.N., 2000. Anatomical and biochemical characterization of the calcium effect on *Eucalyptus urophylla* callus morphogenesis *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 63, 143-154.
- Arzani, A., Mirodjagh, S.S., 1999. Response of durum wheat cultivars to immature embryo culture, callus induction and *in vitro* salt stress. Plant, Cell, Tissue and Organ Culture, 58, 67-72.
- Arzani, A., Darvey, N.L., 2001. The effect of colchicine on triticales anther-derived plants: Microspore pre-treatment and haploid-plant treatment using a hydroponic recovery system. Euphytica, 122, 235-241.
- Arzani, A., Darvey, N.L., 2002. Androgenetic response of heterozygous triticales populations using a greenhouse hydroponic system. Euphytica, 127, 53-60.
- Asakaviciute, R., 2008. Androgenesis in anther culture of Lithuanian spring barley (*Hordeum vulgare* L.) and potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars. Turkish Journal of Biology, 32, 155-160.
- Ashok Kumar, H.G., Ravishankar, B.V., Murthy, H.N., 2004. The influence of polyamines on androgenesis of *Cucumis sativus* L. European Journal of Horticultural Science, 69, 201-205.
- Ashraf, M., Foolad, M.R., 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environmental and Experimental Botany, 59, 206-216.
- Atanassov, A., Zagorska, N., Boyadjiev, P., Djilianov, D., 1995. *In vitro* production of haploid plants. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 11, 400-408.
- Ayed, O.S., De Buyser, J., Picard, E., Trifa, Y., Slim Amara, H., 2010. Effect of pre-treatment on isolated microspores culture ability in durum wheat (*Triticum turgidum* subsp. *Durum* Desf.). Journal of Plant Breeding and Crop Science, 2 (2), 30-38.
- Babaoğlu, M., Yorgancılar, M., Akbudak, M.A., 2002. Doku Kültürü: Temel Laboratuvar Teknikleri. Bitki Biyoteknolojisi I (Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S., eds.), Selçuk Üniversitesi Basımevi, pp. 1-35, Konya.
- Bajaj, Y.P.S., 1990. *In vitro* production of haploids and their use in cell genetics and plant breeding. In: Biotechnology in agriculture and forestry, part I. Haploids in crop improvement. (Bajaj, Y.P.S., ed.), vol 12. Springer, pp. 1-44, Berlin.
- Ball, S.T., Zhou, H.P., Konzak, C.F., 1993. Influence of 2, 4D, IAA and duration of callus induction in anther culture of spring wheat. Plant Science, 90, 195-200.

- Barnabás, B., Phaler, P.L., Kovacs, G., 1991. Direct effect of colchicine on the microspore embryogenesis to produce dihaploid plants in wheat (*Triticum aestivum* L.). Theoretical and Applied Genetics, 81, 675-678.
- Bavrina, T.V., Lozhnikova, V.N., Culafic, L., Zhivanovich, B., 2002. Flowering of cultivated green and SAN 9789-treated *Chenopodium rubrum* plants exposed to white, blue, and red light. Russian Journal of Plant Physiology, 49 (4), 460-464.
- Benderradji, L., Bouzerzou, H., Djekoun, A., Yekhleland, N., Benmahammed, A., 2007. Effects of NaCl stress on callus proliferation and plant regeneration from mature embryos of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars Mahon Demias and Hidhab. Plant Tissue Culture and Biotechnology, 17 (1), 19-27.
- Benkirane, H., Sabounji, K., Chlyah, A., Chlyah, H., 2000. Somatic embryogenesis and plant regeneration from fragments of immature inflorescences and coleoptiles of durum wheat. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 61, 107-113.
- Bjørnstad, A., Opsahl-Ferstad, H.G., Aasmo, M., 1989. Effects of donor plant environment and light during incubation of anther cultures of some spring wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 17, 27-37.
- Bohnert, H.J., Jensen, R.G., 1996. Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. Trends in Biotechnology, 14, 89-97.
- Bohorova, N.E., Pfeiffer, W.H., Mergoum, M., Crossa, J., Pacheco, M., Estanol, P., 2001. Regeneration potential of CIMMYT durum wheat and triticale varieties from immature embryos. Plant Breeding, 120, 291-295.
- Bommineni, V.R., Jauhar, P.P., 1996. Regeneration of plantlets through isolated scutellum culture of durum wheat. Plant Science, 116, 197-203.
- Broughton, S., 2008. Ovary co-culture improves embryo and green plant production in anther culture of Australian spring wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant, Cell, Tissue and Organ Culture, 95 (2), 185-195.
- Carrier, D.J., Cunningham, E.J., Taylor, C.D., Dunstan, I.D., 1997. Sucrose requirement and lipid utilization during germination of interior spruce somatic embryo. Plant Cell Repotrs, 16, 550-554.
- Caswell, K.N., Leung, N.L., Chibbar, R.N., 2000. Regeneration of fertile plants from immature inflorescences of four Canadian spring wheat cultivars. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 60, 69-73.

- Chauhan, H., Khurana, P., 2011. Use of doubled haploid technology for development of stable drought tolerant bread wheat (*Triticum aestivum* L.) transgenics. *Plant Biotechnology Journal*, 9 (3), 408-417.
- Chen, C., Dickman, M.B., 2005. Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 3459-3464.
- Chiancone, B., Tassoni, A., Bagni, N., Germana, M.A., 2006. Effect of polyamines on *in vitro* anther culture of *Citrus clementina* Hort.ex Tan. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 87, 145-153.
- Chin, J.C., Scott, K.J., 1977. Studies on the formation of roots and shoots in wheat callus cultures. *Annals of Botany*, 41, 473-481.
- Chowdhury, M.A.M., Moseki, B., Bowling, D.J.F., 1995. A method for screening rice plants for salt tolerance. *Plant and Soil*, 171, 317-322.
- Chu, C.C., Wang, C.C., Sun, C.S., Hsu, C., Yin, K.C., Bi, F.Y., 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen source. *Scientia Sinica*, 18, 659-668.
- Chu, C.C., 1978. The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. In: *Proc Symposium Plant Tissue Culture*. Science Press, pp. 43-50. Peking.
- Cistue', L., Soriano, M., Castillo, A.M., Valles, M.P., Sanz, J.M., Echavarri, B., 2006. Production of doubled haploids in durum wheat (*Triticum turgidum* L.) through isolated microspore culture. *Plant Cell Reports*, 25, 257-264.
- Cistue', L., Romagosa, I., Batlle, F., Echavarri, B., 2009. Improvements in the production of doubled haploids in durum wheat (*Triticum turgidum* L.) through isolated microspore culture. *Plant Cell Reports*, 28, 727-735.
- Collin, H.A., Burton, F.M., Ibrahim, K.M., Collins, J.C., 1990. Transmission of salt tolerance from tissue cultures to seed progeny in *Coleus blume*. (Abst.) 7th International Congress on Plant Tissue and Cell Culture, p. 151, Amsterdam.
- Crawley, M. J. 1997. Life History and Environment. In: *Plant Ecology*. (Crawley, M.J., -ed.). Blackwell, pp. 73-131, UK.
- Dasgupta, M., Sahoo, M.R., Kole, P.C., Mukherjee, A., 2008. Evaluation of orange-fleshed sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) genotypes for salt tolerance through shoot apex culture under *in vitro* NaCl mediated salinity stress conditions. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*, 94, 161-170.
- Datta, S.K., 2005. Androgenic haploids: factors controlling development and its application in crop improvement. *Current Science*, 89, 1870-1878.

- Davenport, R.J., Reid, R.J., Smith, F.A., 1997. Sodium-calcium interactions in two wheat species differing in salinity tolerance. *Physiologia Plantarum*, 99, 323-327.
- Davis, P., 1985. Flora of Turkey and the east aegean islands. Vol. 9, Edinburgh University Press.
- Delauney, A.J., Verma, D.P.S., 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The Plant Journal*, 4, 215-223.
- Devaux, P., Hou, L., Ullrich, S.E., Huang, Z., Kleinhofs, A., 1993. Factors affecting anther culturability of recalcitrant barley genotypes. *Plant Cell Reports*, 13, 32-36.
- Doğan, M., Kılıç, H., Aktan, A., Can, N.E., 2009. Tuz stresi altındaki domates (*Lycopersicon sp.*) fidelerinde kalsiyum miktarı değişimleri. *Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 21 (2), 103-108.
- Doğramacı-Altuntepe, M., Peterson, T.S., Jauhar, P.P., 2001. Anther culture-derived regenerants of durum wheat and their cytological characterization. *The Journal of Heredity*, 92, 56-64.
- Duncan, E.J., Heberle, E., 1976. Effect of temperature shock on nuclear phenomena in microspores of *Nicotiana tabacum* and consequently on plantlet production. *Protoplasma*, 90, 173-177.
- Dunwell, J.M., 1981. Stimulation of pollen embryo induction in tobacco by pretreatment of excised anthers in a water-saturated atmosphere. *Plant Science Letters*, 21, 9-13.
- Dunwell, J.M., Cornish, M., De Courcel, A.G.L., Middlefell-Williams, J.E., 1983. Induction and growth of 'microspore-derived' embryos of *Brassica napus* ssp. *oleifera*. *Journal of Experimental Botany*, 34 (12), 1768-1778.
- Dunwell, J.M., Thurling, N., 1985. Role of sucrose in microspore embryo production in *Brassica napus* ssp. *oleifera*. *Journal of Experimental Botany*, 36, 1478-1491.
- Dunwell, J.M., 2010. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. *Plant Biotechnology Journal*, 8, 377-424.
- Ekiz, H., Konzak, C.F., 1991. Nuclear and cytoplasmic control of anther culture response in wheat: I. analyses of alloplasmic lines. *Crop Science*, 31, 1421-1427.
- El-Hennawy, M.A., 1996. Anther culture response and salt tolerance in some barely genotypes. *Annals of Agricultural Science*, 41 (2), 761-784.

- Etienne, H., Lartaud, M., Carron, M.P., Michaux-Ferriere, N., 1997. Use of calcium to optimize long term proliferation of friable calluses and plant regeneration in *Hevea brasiliensis* (Muell. Arg.). *Journal of Experimental Botany*, 48, 129-137.
- Fadel, F., Wenzel, G., 1990. Medium-genotype interaction on androgenetic haploid production in wheat. *Plant Breeding*, 105, 278-282.
- Farrukh, J., 2004. *In vitro* salt tolerance in wheat. I. Growth and ions accumulation. *International Journal of Agriculture and Biology*, 4, 459-461.
- Foroughi-Wehr, B., Friedt, W., Wenzel, G., 1982. On the genetic improvement of androgenetic haploid formation in *Hordeum vulgare* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 62, 246-248.
- Foroughi-Wehr, B., Wenzel, G., 1993. Andro- and parthenogenesis. In *Plant Breeding Principles and prospects*. (Hayward, M., Bosemark, N.O., Romagosa, I., -eds.) Chapman and Hall, pp. 261-279, London.
- Fu, F.L., He, J., Zhang, Z.Y., Zhou, S.F., Zhang, S.Z., Li, W.C., 2011. Further improvement of N6 medium for callus induction and plant regeneration from maize immature embryos. *African Journal of Biotechnology*, 10 (14), 2618-2624.
- Gaillard, A., Vergne, P., Beckert, M., 1991. Optimization of maize microspore isolation and culture conditions for reliable plant regeneration. *Plant Cell Reports*, 10, 55-58.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K., 1968. Nutrient requirement suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50, 151-158.
- Gangopadhyay, G., Basu, S., 2000. Proline as osmotic stressmarker in in vitro system. In: *Plant Physiology, Biochemistry and Plant Molecular Biology*. (Hemantaranjan, A., ed.), Scientific Publishers, pp. 283-304, Jodhpur, India.
- Gerdakaneh, M., Mozafari, A.A., Khalighi, A., Mardah, A.S., 2010. The effects of exogenous proline and osmotic stress on morpho-biochemical parameters of strawberry callus. *African Journal of Biotechnology*, 9 (25), 3775-3779.
- Germana, M.A., 2011. Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*, 104, 283-300.
- Gervais, C., Newcomb, W., Simmonds, D.H., 2000. Rearrangement of the actin filament and microtubule cytoskeleton during induction of microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. cv. Topas. *Protoplasma*, 213, 194-202.

- Gonzalez, J.M., Friero, E., Jouve, N., 2001. Influence of genotype and culture medium on callus formation and plant regeneration from immature embryos of *Triticum turgidum* Desf. cultivars. *Plant Breeding*, 120, 513-517.
- Gonzalez-Melendi, P., Ramirez, C., Testillano, P.S., Kumlehn, J., Risueno, M.C., 2005. Three dimensional confocal and electron microscopy imaging define the dynamics and mechanisms of diploidisation at early stages of barley microspore-derived embryogenesis. *Planta*, 222, 47-57.
- Gupta, S., Srivastava, J., 1990. Effect of salt stress on morphophysiological parameters in wheat. *Indian Journal of Plant Physiology*, 32, 162-171.
- Gupta, P. K., 2009. Plant cell and tissue culture: Production and uses of haploids. In: *Biotechnology and Genomics*. Global Media, pp. 401-414, India
- Hare, P.D., Cress, W.A., 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation*, 21, 79-102.
- Hare, P.D., Cress, W.A., Staden, J.V., 1998. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell and Environment*, 21, 535-553.
- Hassawi, D. S., Qrunfleh, I., Dradkah, N., 2005. Production of doubled haploids from some jordanian wheat cultivars via anther culture technique. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 3, 161-164.
- Hause, B., van Veenendaal, W.L.H., Hause, G., van Lammeren, A.A.M., 1994. Expression of polarity during early development of microspore derived and zygotic embryos of *Brassica napus* L. cv. Topas. *Botanica Acta*, 107, 407-415.
- He, D.G., Yang, Y.M., Scott, K.J., 1998. A comparison of scutellum callus and epiblast callus induction in wheat: the effect of genotype, embryo age and medium. *Plant science*, 57, 225-233.
- Heberle-Bors, E., 1983. Induction of embryogenic pollen grains and subsequent embryogenesis in *Nicotiana tabacum* L. by treatments of the pollen donor plants with feminizing agents. *Physiologia Plantarum*, 59, 67-72.
- Heberle-Bors, E., 1985. *In vitro* haploid formation from pollen: a critical review. *Theoretical and Applied Genetics*, 71, 361-374.
- Heberle-Bors, E., 1989. Isolated pollen culture in tobacco: plant reproductive development in a nutshell. *Sexual Plant Reproduction*, 2, 1-10.
- Hoekstra, S., van Zijderveld, M.H., Louwerse, J.D., Heidekamp, F., van der Mark, F., 1992. Anther and microspore culture of *Hordeum vulgare* L. cv Igri. *Plant Science*, 86, 89-96.

- Hosp, J., Maraschin, S.F., Touraev, A., Boutilier, K., 2007. Functional genomics of microspore embryogenesis. *Euphytica*, 158, 275-285.
- Hsu, S.Y., Hsu, Y.T., Kao, C.H., 2003. The effect of polyethylene glycol on proline accumulation in rice leaves. *Biologia Plantarum*, 46, 73-78.
- Htwe, N.N., Maziah, M., Ling, H.C., Zaman, F.Q., Zain, A.M., 2011. Responses of some selected Malaysian rice genotypes to callus induction under *in vitro* salt stress. *African Journal of Biotechnology*, 10 (3), 350-362.
- Hu, T., Kahsa, K.J., 1997. Improvement of isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) through ovary co-culture. *Plant Cell Reports*, 16, 520-525.
- Huang, B., 1996. Gametoclonal variation in crop improvement. In vitro haploid production in higher plants. (Jain, S.M., Sopory, S.K., Veilleux, R.E., -eds.) Kluwer, pp. 73-91, Dordrecht.
- Immonen, S., Robinson, J., 2000. Stress treatments and ficoll for improving green plant regeneration in triticale anther culture. *Plant Science*, 150, 77-84.
- Ingram, H.M., Power, J.B., Lowe, K.C., Davey, M.R., 2000. Microspore-derived embryo induction from cultured anthers of wheat. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 60, 235-238.
- Islam, S.M.S., 2010. The effect of colchicine pretreatment on isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Australian Journal of Crop Science*, 4 (9), 660-665.
- Jafari, M.H.S., Kafi, M., Astaraie, A., 2009. Interactive effects of NaCl induced salinity, calcium and potassium on physiomorphological traits of sorghum (*Sorghum bicolor* L.). *Pakistan Journal of Botany*, 41 (6), 3053-3063.
- Jain, S.M., 2001. Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica*, 118, 153-166.
- J'Aiti, F., Benlhabib, O., Sharma, H.C., El Jaafari, S., El Hadrami, I., 1999. Genotypic variation in anther culture and effect of ovary coculture in durum wheat. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*, 59, 71-76.
- Jaleel, C.A., Kishorekumar, P., Manivannan, A., Sankar, B., Gomathinayagam, M., Panneerselvam, R., 2008. Salt stress mitigation by calcium chloride in *Phyllanthus amarus*. *Acta Botanica Croatica*, 67, 53-62.
- Jähne, A., Lörz, H., 1995. Cereal microspore culture. *Plant Science*, 109, 1-12.

- Jiang, W., Cho, M.J., Lemaux, P.G., 1998. Improved callus quality and prolonged regenerability in model and recalcitrant barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars. *Plant Biotechnology*, 15, 63-69.
- Johnson, R.W., Asokanthan, S.P., Griffith, M., 1997. Water and sucrose regulate canola embryo development. *Physiologia Plantarum*, 101, 361-366.
- Juhasz, G.A., Simon-Sarkadi, L., Velich, I., Varro, P., 1997. Studies of nonionic osmotic stress on bean callus and seedling cultures. *Acta Horticulturae*, 44, 455-456.
- Kao, K.N., 1981. Plant formation from barley anther cultures with ficoll media. *Zeitschrift für pflanzenphysiology*, 103, 437-443.
- Kao, K.N., Saleem, M., Abrams, S., Pedras, M., Horn, D., Mallard, C., 1991. Culture conditions for induction of green plants from barley microspores by anther culture methods. *Plant Cell Reports*, 9 (11), 595-601.
- Kasha, K.J., Hu, T.C., Oro, R., Simion, E., Shim, Y.S., 2001. Nuclear fusion leads to chromosome doubling during mannitol pretreatment of barley (*Hordeum vulgare* L.) microspores. *Journal of Experimental Botany*, 52 (359), 1227-1238.
- Kasha K.J., Maluszynsky, M., 2003. Production of doubled haploids in crop plants. An introduction. Doubled haploid production in crop plants. A manual. (Maluszynsky, M., Kasha, K.J., Forster, B.P., Szaejko, I.,-eds.) Kluwer/FAO-IAEA, pp. 1-4, Dordrecht/Vienna.
- Kasha, K.J., 2005. Chromosome doubling and recovery of doubled haploid plants. In: Haploids in crop improvement II. (Palmer, C.E., Keller, W.A., Kasha, K.J., -eds.) Springer, pp. 123-152, Heidelberg.
- Kavi Kishore, P.B., Sangam, S., Amrutha, R.N., Laxmi, P.S., Naidu, K.R., Rao, K.R.S.S., Rao, S., Reddy, K.J., Theriappan, P., Sreenivasulu, N., 2005. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science*, 88, 424-438.
- Keller, W.A., Rajhathy, T., Lacapra, J., 1975. *In vitro* production of plants from pollen in *Brassica campestris*. *Canadian Journal of Genetic and Cytology*, 17, 655-666.
- Kenny, L., Caligari, P.D.S., 1996. Androgenesis of the salt tolerant shrub *Atriplex glauca*. *Plant Cell Reports*, 15, 829-832.
- Ketchum, R.E.B., Warren, R.C., Klima, L.J., Lopez-Gutierrez, F., Nabors, M.W., 1991. The mechanism and regulation of proline accumulation in suspension

- cultures of the halophytic grass *Distichlis spicata* L. Journal of Plant Physiology, 137, 368-374.
- Kim, S.H., Kim, S.K., 2002. Effect of sucrose level and nitrogen source on fresh weight and anthocyanin production in cell suspension culture of 'Sheridan' Grape (*Vitis* spp.). Journal of Plant Biotechnology, 4, 2327-2330.
- Kim, M.K., Baenziger, S., 2005. A simple wheat haploid and doubled haploid production system using anther culture. In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant, 41 (1), 22-27.
- Kintizos, S.E., Triantafyllou, M., Drossopoulos, J., 1996. Effect of genotype and different growth regulator treatments on callus induction, proliferation and plant regeneration from mature wheat embryos. Cereal Research Communications, 24, 147-153.
- Kishore, P.B.K., Dange, V., 1990. Sucrose metabolism in callus cultures of cotton during growth. Indian Journal of Experimental Biology, 28, 352-355.
- Kondic- Šipka, A., Kobiljski, B., Hristov, N., 2007. High production of wheat double haploids via anther culture. Genetica, 39 (3), 405-411.
- Köşkeroğlu, S., 2006. Tuz ve su stresi altındaki mısır (*Zea mays* L.) bitkisinde prolin birikim düzeyleri ve stres parametrelerinin araştırılması. Muğla Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 106s.
- Krämer, U., Pickering, I.J., Prince, R.G., Raskin, I., Salt, D.E., 2000. Subcellular localization and speciation of Nickel in Hyperaccumulator and non-accumulator *Thlaspi* species. Plant Physiology, 122, 1343-1353.
- Kupper, H., Lombi, E., Zhao, F.J., McGrath, S.P., 2000. Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. Planta, 212, 75-84.
- Labbani, Z., Richard, N., de Buyser, J., Picard, E., 2005. Chlorophyllian durum wheat plants obtained by isolated microspores culture: importance of the pre-treatment. Comptes Rendus Biologies, 328, 713-723.
- Lacerda, C.F., Cambraia, J., Oliva, M.A., Ruiz, H.A., 2005. Changes in growth and in solute concentrations in sorghum leaves and roots during salt stress recovery. Environmental and Experimental Botany, 54, 69-76.
- Lardet, L., Martin, F., Dessailly, F., Carron, M.P., Montoro, P., 2007. Effect of exogenous calcium on post-thaw growth recovery and subsequent plant regeneration of cryopreserved embryogenic calli of *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.). Plant Cell Reports, 26 (5), 559-569.

- Lauchli, A., 1990. Calcium, salinity and plasma membrane. In: Calcium in Plant Growth and Development (Leonard, R.J., Hepler, P.K., -eds.) The American Society of Plant Physiologists, pp. 26-35, Rockville, M.D.
- Lazaridou, T.B., Lithourgidis, A.S., Kotzamanidis, S.T., Roupakias, D.G., 2005. Anther culture response of barley genotypes to cold pretreatments and culture media. *Russian Journal of Plant Physiology*, 52, 696-699.
- Lee, K.S., Choi, W.Y., Ko, J.C., Kim, T.S., Gregoria, G.B., 2003. Salinity tolerance of japonica and indica rice (*Oryza sativa* L.) at the seedling stage. *Planta*, 216, 1043-1046.
- Letarte, J., Simion, E., Miner, M., Kahsa, K.J., 2006. Arabinogalactans and arabinogalactan proteins induce embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore culture. *Plant Cell Reports*, 24, 691-698.
- Lewitt, J., 1980. Salt stresses. In: Responses of Plants to Environmental Stresses, 607p.
- Lichtenhaler, M. D., 1996. Vegetation Stress : an Introduction to the stress concept in plants. *Journal of Plant Physiology*, 148, 4-14.
- Liang, G.H., Xu, A., Tang, H., 1987. Direct generation of wheat haploids via anther culture. *Crop Science*, 27, 336-339.
- Liu, C.Y., Shepherd, K.W., Rathjen, A.J., 1996. Improvement of durum wheat pastamaking and breadmaking qualities. *Cereal Chemistry*, 73, 155-166.
- Luckett, D.J., Venkatanagappa, S., Darvey, N.L., Smithard, R.A., 1991. Anther culture of Australian wheat germplasm using modified C17 medium and membrane rafts. *Australian Journal of Plant Physiology*, 18, 357-367.
- Lynch, J., Lauchli, A., 1985. Salt stress disturbs the calcium nutrition of barley (*Hordeum vulgare* L.). *New Phytologist*, 99, 345-354.
- Maddock, S.E., Lancaster, V.A., Risiott, R., Franklin, J., 1983. Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of 25 cultivars of wheat (*Triticum aestivum*). *Journal of Experimental Botany*, 34, 915-926.
- Maheshwari, S.C., Rashid, A., Tyagy, A.K., 1982. Haploid from pollen grains-retrospect and prospect. *American Journal of Botany*, 69, 865-879.
- Malik, M.R., Wang, F., Dirpaul, J.M., Zhou, N., Polowick, P.L., Ferrie, A.M.R., Krochko, J.E., 2007. Transcript profiling and identification of molecular markers for early microspore embryogenesis in *Brassica napus*. *Plant Physiology*, 144, 134-154.

- Maluszynski, M., Kahsa, K.J., Szarejko, I., 2003. Published double haploid protocols in plant species. In: Wheat anther culture: a manual. (Tuveesson, S., von Post, R., Ljungberg, A., -eds.) Kluwer, pp. 71-77, Dordrecht.
- Maraschin, S.D., Lamers, G.E.M., de Pater, B.S., Spaink, H.P., Wang, M., 2003. 14-3-3 isoforms and pattern formation during barley microspore embryogenesis. *Journal of Experimental Botany*, 54, 1033-1104.
- Maraschin, S.F., de Priester, W., Spaink, H.P., Wang, M., 2005. Androgenics witch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. *Journal of Experimental Botany*, 56 (417), 1711-1726.
- Marchand, S., Fonquerne, G., Clermont, I., Laroche, L., Huynh, T.T., Belzile, F.J., 2008. Androgenic response of barley accessions and F1s with Fusarium head blight resistance. *Plant Cell Reports*, 27, 443-451.
- Marsolais, A.A., Kasha, K.J., 1985. Callus induction from barley microspores. The role of sucrose and auxin in a barley anther culture medium. *Canadian Journal of Botany*, 63, 2209-2212.
- Mattioni, C., Lacerenze, N.G., Troccoli, A., De Leonardis, A.M., Di Fonzo, N., 1997. Water and salt stress-induced alterations in proline metabolism of *Triticum durum* seedlings. *Physiologia Plantarum*, 101, 787-792.
- Mazars, C., Bourque, S., Mithofer, A., Pugin, A., Ranjeva, R., 2009. Calcium homeostasis in plant cell nuclei. *New Phytologist*, 181, 261-274.
- Mehta, U.J., Krishnamurthy, V.K., Hazra, S., 2000. Regeneration of plant via adventitious bud formation from zygotic embryo axis of tamarind (*Tamarindus indica*). *Current Science*, 78, 1231-1232.
- Mendoza, M.G., Kaepler, H.F., 2002. Auxin and sugar effects on callus induction and plant regeneration frequencies from mature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.). In *Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 38, 39-45.
- Miha, M.A.A., Pathan, M.S., Quayum, H.A., 1996. Production of salt tolerant rice breeding line via doubled haploid. *Euphytica*, 91, 285-288.
- Mohammadi-Nejad, G., Arzani, A., Rezai, A.M., Singh, R.K., Gregorio, G.B., 2008. Assessment of rice genotypes for salt tolerance using microsatellite markers associated with the saltol QTL. *African Journal of Biotechnology*, 7, 730-736.
- Montoro, P., Etienne, H., Micbaux-Ferriere, N., Carron, M.P., 1993. Callus friability and somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 33, 331-8.
- Morris, S.R., 2004. Grain: Quality attributes. In: *Encyclopedia of Grain Science*. (Wrigley, C., -ed.) Elsevier, pp. 238-254, Amsterdam.

- Morrison, R.A., Evans, D.A., 1987. Gametoclonal variation. *Plant Breeding Reviews*, 5, 359-391.
- Munns, R., Hare, R.A., James, R.A., Rebetzke, G.J., 2000. Genetic variation for improving the salt tolerance of durum wheat. *Australian Journal of Agricultural Researches*, 51, 69-74.
- Munns, R., James, R.A., 2003. Screening methods for salt tolerance: A case study with tetraploid wheat. *Plant Soil*, 253, 239-250.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- Nabors, M.W., Dykes, T.A., 1985. Tissue culture of cereal cultivars with increased salt, drought and acid tolerance. In *Biotechnology in International Agricultural Research* (International Rice Research Institute, -eds.), pp. 121-128.
- Nasırcılar, A.G., Turgut, K., Fışkın, K., 2006. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of different wheat genotypes. *Pakistan Journal of Botany*, 38 (2), 637-645.
- Navarro, J.M., Martines, V., Carvajal, M., 2000. Ammonium, bicarbonate and calcium effects on tomato plants grown under saline conditions. *Plant Science*, 157, 89-96.
- Niazi, B.H., Zaman, B., Salim, M., Athar, M., 2007. Growth response, water relations and K/Na ratio in wheat under sodium and calcium interactions. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 11 (1), 47-50.
- Nomura, K., Komamine, A., 1986. Somatic embryogenesis in cultured carrot cells. *Development Growth and Differentiation*, 28, 511-17.
- Obert, B., Barnabás, B., 2004. Colchicine induced embryogenesis in maize. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*, 77, 283-285.
- Ohnoutková, L., Novotný, J., Mullerová, E., Vágera, J., Kucera, L., 2000. Is a cold pre-treatment really needed for induction of *in vitro* androgenesis in barley and wheat? *Biotechnological approaches for utilisation of gametic cells*. Cost 824 final meeting, 277, 33-37, Bled, Slovenia.
- Olsen, F.L., 1987. Induction of microspore embryogenesis in cultured anthers of *Hordeum vulgare*. The effects of ammonium nitrate, glutamine and asparagine as nitrogen sources, *Carlsberg Research Communication*, 52, 393-404.

- Osolnik, B., Bohanec, B., Jelaska, S., 1993. Stimulation of androgenesis in white cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata) anthers by low temperature and anther dissection. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 32, 241-246.
- Otani, M., Shimada, T., 1995. Effect of synthetic medium on microspore-derived embryoid formation of tetraploid wheat species. *Cereal Research Communications*, 23, 345-350.
- Oudija, F., Ismail, M., Amssa, M., 2002. Effect of the concentration of NaCl on somatic embryogenesis and the regeneration capacities of wheat. *African Crop Science Journal*, 10, 211-219.
- Ouyang, J.W., Zhou, S.M., Jia, S.E., 1983. The response of anther culture to culture temperature in *Triticum aestivum*. *Theoretical Applied Genetics*, 66, 101-109.
- Özgen, M., Turet, M., Altmok, S., Sancak, C., 1998. Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *Plant Cell Repots*, 18, 331-335.
- Özkum, D., Tıpırdamaz, R., Ellialtıoğlu, Ş., 2000. Relationship between endogenous abscisic acid content of anthers and in vitro androgenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.). 4th International Symposium on in vitro Culture and Horticultural Breeding. *Acta Horticulturae*, 560, 327-329, Tampere, Finland.
- Öztürk, L., Demir, Y., 2002. In vivo and in vitro protective role of proline. *Plant Growth Regulation*, 38, 259-264.
- Papenfuss, J.M., Carman, J.G., 1987. Enhanced regeneration from wheat callus cultures using dicamba and kinetin. *Crop Science*, 27, 588-593.
- Parida, A.K., Dagaonkar, V.S., Phalak, M.S., Umalkar, G.V., Aurangabadkar, L.P., 2007. Alterations in photosynthetic pigments, protein and osmotic components in cotton genotypes subjected to short-term drought stress followed by recovery. *Plant Biotechnology Reports*, 1, 37-48.
- Pauk, J., Puolimatka, M., Tóth, K.I., Monostori, T., 2000. *In vitro* androgenesis of triticale in isolated microspore culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 61, 221-229.
- Phillips, R.L., Kaeppler, S.M., Olhoft, P., 1994. Genetic instability of plant tissue cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91, 5222-5226.
- Pietrobon, D., Virgilio, F.O., Pozzea, T., 1990. Structural and functional aspects of calcium homeostasis in eukaryotic cells. *European Journal of Biochemistry*, 193, 559-622.

- Poovaiah, B.W., Reddy, A.S.N., 1987. Calcium messenger system in plants. CRC in Plant Science, 6, 47-103.
- Poustini, K., Siosemardeh, A., 2004. Ion distribution in wheat cultivars in response to salinity stress. Field Crops Research, 85, 125-133.
- Powell, W., 1988. The influence of genotype and temperature pretreatment on anther culture response in barley (*Hordeum vulgare* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 12, 291-297.
- Powell, W., 1990. Environmental and genetic aspects of pollen embryogenesis. In: Biotechnology in agriculture and forestry, part I. (Bajaj, Y.P.S., -ed.) Haploids in crop improvement, Springer, pp. 44-65, Berlin.
- Przetakiewicz, A., Orczyk, W., Nadolska-Orczyk, A., 2003. The effect of auxin on plant regeneration of wheat, barley and triticale. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 73, 245-256.
- Pulido, A., Bakos, F., Castillo, A., Valle's, M.P., Barnabas, B., Olmedilla, A., 2005. Cytological and ultrastructural changes induced in anther and isolated-microspore cultures in barley: Fe deposits in isolated-microspore cultures. Journal of Structural Biology, 149, 170-181.
- Purnhauser, L., Medgyesy, P., Czako, M., Dix, P.J., Marton, L., 1987. Stimulation of shoot regeneration in *Triticum aestivum* and *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. tissue cultures using the ethylene inhibitor AgNO₃. Plant Cell Reports, 6, 1-4.
- Quyang, J., 1986. Induction of pollen plants in (*Triticum aestivum* L.) haploids of higher plants *in vitro*. (Hu, H., Yang, H., -eds.) Springer, Berlin Hiedelberg, Newyork, Tokyo, pp. 26-41.
- Raghavan, V., 1990. From microspore to embryo: faces of the angiosperm pollen grain. In: Progress in plant cellular and molecular biology. (Nijkamp, H.J.J., van der Plas, L.H., van Hartigik, J., -eds.) Kluwer, pp. 213-221, Dordrecht.
- Raghavan, V., 1997. Molecular embryology of flowering plants. Cambridge University Press, New York, 690p.
- Rahman, M., Soomro, U.A., Haq, Z., Gul, S., 2008. Effects of NaCl salinity on wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. World Journal of Agricultural Sciences, 4 (3), 398-403.
- Raina, S.K., Irfan, S.T., 1998. High-frequency embryogenesis and plantlet regeneration from isolated microspores of indica rice. Plant Cell Reports, 17, 957-962.

- Rajyalakshmi, K., Chowdhry, C.N., Maheshwari, N., Maheshwari, S.C., 1995. Anther culture response in some Indian wheat cultivars and the role of polyamines in induction of haploids. *Phytomorphology*, 45, 139-145.
- Raquin, C., 1983. Utilization of different sugars of carbon sources for in vitro anther culture of *Petunia*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 111, 453-457.
- Rashed, M.A., 1989. Significance of protoplast in predicting salt tolerant wheat varieties. *Egyptian Journal of Genetics and Cytology*, 18, 285-290.
- Rashid, H., Ghani, R.A., Chaudhry, Z., 2002. Effect of media, growth regulators and genotypes on callus induction and regeneration in wheat (*Triticum aestivum*). *Biotechnology*, 1 (1), 49-54.
- Redha, A., Talaat, A., 2008. Improvement of green plant regeneration by manipulation of anther culture induction medium of hexaploid wheat. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*, 92, 141-146.
- Redha, A., Islam, S., 2009. Effect of selected stress factors on androgenesis of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Kuwait Journal of Science and Engineering*, 37 (1).
- Redha, A., Suleman, P., 2010. Effects of exogenous application of polyamines on wheat anther cultures. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*, 105 (3), 345-353.
- Reid, R.J., Smith, F.A., 2000. The limits of sodium/calcium interactions in plant growth. *Australian Journal of Plant Physiology*, 27, 709-715.
- Reinert, J., Bajaj, Y.P.S., 1977. Anther culture: haploid production and its significance. In: *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture*. (Reinert, J., Bajaj, Y.P.S., -eds.) Springer, pp. 251-267, Berlin.
- Reynolds, T.L., 1997. Pollen embryogenesis. *Plant Molecular Biology*, 33, 1-10.
- Reynolds, T.L., Crawford, R.L., 1997. Effects of light on the accumulation of abscisic acid and expression of an early cysteinylabeled metallothionein gene in microspores of *Triticum aestivum* during induced embryogenic development. *Plant Cell Reports*, 16 (7), 458-463.
- Rhodes, D., Hanson, A.D., 1993. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher-plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 44, 357-384.
- Richards, R.A., 1996. Defining selection criteria to improve yield under drought. *Plant Growth Regulation*, 20, 57-66.

- Rihova, L., Tupy, J., 1999. Manipulation of division symmetry and developmental fate in cultures of potato microspores. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*, 59, 135-145.
- Rus, A., Panoff, M., Perez-Alfocea, F., Bolarin, M.C., 1999. NaCl responses in tomato calli and whole plants. *Journal of Plant Physiology*, 155, 727-733.
- Rus, A.M., Rios, S., Olmos, E., Santa- Cruz, A., Bolarin, M.C., 2000. Long term culture modifies the salt responses of callus lines of salt- tolerant and salt-sensitive tomato species. *Journal of Plant Physiology*, 157, 413-420.
- Salamini, F., Özkan, H., Brandolini, A., Schafer-Pregl, R., Martin, W., 2002. Genetics and geography of wild cereal domestication in the Near East. *Nature Reviews Genetics*, 3 (6), 429-441.
- Sangwan, R.S., Sangwan-Norreel, B.S., 1990. Anther and pollen culture. In: *Plant tissue culture. Applications and limitations*. (Bhajwari, S.S., -ed.) Elsevier, pp. 220-241, Amsterdam.
- Santos, M.A., Camara, T., Rodriguez, P., Claparols, I., Torne, J.M., 1996. Influence of exogenous proline on embryogenic and organogenic maize callus subjected to salt stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 47, 59-65.
- Satyavathi, V.V., Jauhar, P.P., Elias, E.M., Rao, M.B., 2004. Effects of growth regulators on *in vitro* plant regeneration in durum wheat. *Crop Science*, 44, 1839-1846.
- Savaşkan, Ç., Szarejko, I., Toker, M. C., 1999. Callus production and plant regeneration from anther culture of some Turkish barley cultivars. *Turkish Journal of Botany*, 23, 359-365.
- Sayaslan, A., 2007. Tahılların kimyasal bileşimi ve kalite. Ders notları.
- Seçmen, Ö.İ., Gemici, Y., Gök, G., Bekat, L., Leblebici, E., 2000. Tohumlu Bitkiler Sistematigi. Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova, İzmir, 975-483-028-2.
- Seguí-Simarro, J.M., Nuez, F., 2008. How microspores transform into haploid embryos: changes associated with embryogenesis induction and microspore derived embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, 134, 1-12.
- Senadhira, D., Zapata-Arias, F.J., Gregorio, G.B., Alejar, M.S., de la Cruz, H.C., Padolina, T.F., Galvez, A.M., 2002. Development of the first salt-tolerant rice cultivar through indica/indica anther culture. *Field Crops Research*, 76, 103-110.
- Serraj, R., Sinclair, T.R., 2002. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? *Plant, Cell and Environment*, 25, 333-341.

- Shao, H.B., Song, W.Y., Chu, L.Y., 2008. Advances of calcium signals involved in plant anti-drought. *Comptes Rendus Biologies*, 331, 587-596.
- Shariatpanahi, M.E., Bal, U., Heberle-Bors, E., Touraev, A., 2006. Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards *in vitro* embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, 127, 519-534.
- Shen, Z.G., Shen, Q.R., 1992. Effect of NaCl stress on the accumulation of some nitrogenous components in barley seedlings under different nitrogen levels. *Plant Physiology Communications*, 28 (3), 189-191.
- Shevyakova, N.I., Rakitian, V.Y., Muzychko, L.M., Kuznetsov, V.V., 1998. Stress-induced accumulation of proline in relation to salt tolerance of intact plants and isolated cells. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 34, 291-295.
- Shim, Y.S., Kasha, K.J., Simion, E., Letarte, J., 2006. The relationship between induction of embryogenesis and chromosome doubling in microspore cultures. *Protoplasma*, 228, 79-86.
- Snape, J.W., 1989. Doubled haploid breeding: theoretical basis and practical applications. In: Review of advances in plant biotechnology. (Mujeeb-Kazi, A., Sitch, L.A., -eds.) CIMMYT/IRRI, pp. 19-30, Mexico D.F., Mexico, Manila, Philippines.
- Solomon, A., Beer, S., Waisel, Y., Jones, G.P., Paleg, L.G., 1994. Effects of NaCl on the carboxylating activity of Rubisco from *Tamarix jordanis* in the presence and absence of proline related compatible solutes. *Physiologia Plantarum*, 90, 198-204.
- Sopory, S., Munshi, M., 1996. Anther culture. In: *In vitro* haploid production in higher plants. (Mohan, J.M. et al., -eds.) Kluwer, pp. 145-176, Dordrecht.
- Soriano, M., Cistue, L., Castillo, A.M., 2008. Enhanced induction of microspore embryogenesis after n-butanol treatment in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. *Plant Cell Reports*, 27 (5), 805-811.
- Sönmez, B., 2011. Çorak toprakların ıslahı ve yönetimi. *Bilim ve Aklın Aydınlığında Eğitim*, 134s, 52-56.
- Smykal, P., 2000. Pollen embryogenesis-the stress mediated switch from gametophytic to sporophytic development. Current status and future prospects. *Biologia Plantarum*, 43, 481-489.
- Stuart, D.A., Strickland, S.G., Walker, K.A., 1987. Bioreactor production of alfalfa somatic embryos. *Hortscience*, 22, 800-809.

- Sunderland, N., Dunwell, J.M., 1977. Anther and pollen culture. In: Plant tissue and cell culture. (Street, H.E., -ed.) Oxford, Blackwell, pp. 223-265.
- Sunderland, N., 1978. Strategies in the improvement of yields in anther culture. In: Proc Symp Plant Tissue Culture. Science Press, pp. 65-86, Peking.
- TAGEM, 2008. (Türkiye Cumhuriyeti Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü). Bakanlıkça geliştirilen çeşit ve teknolojiler ile kullanım alanları (1963-2008).
- Tiainen, T., 1992. The role of ethylene and reducing agents on anther culture response of tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.). Plant Cell Reports, 10, 604-607.
- Taiz, L., Zeiger, E., 2008. Bitki Fizyolojisi. (Türkan, İ., -ed.) Palme Yayıncılık, Ankara, 690s.
- Taiz, L., Zeiger, E., 2010. Responses and adaptations to abiotic Stress. In Plant Physiology, Fifth Edition. <http://5e.plantphys.net/>. Erişim Tarihi: 01.05.2011.
- Tal, M., 1983. Selection for stress tolerance, In "Handbook Of Plant Cell Culture, Volume 1", Collier Macmillan Publisher, pp. 461-487, London.
- Tantau, H., Balko, C., Brettschneider, B., Melz, G., Dörffling, K., 2004. Improved frost tolerance and winter survival in winter barley (*Hordeum vulgare* L.) by *in vitro* selection of proline overaccumulating lines. Euphytica, 139, 19-32.
- Telmer, C.A., Newcom, W., Simmonds, D.H., 1992. Determination of developmental stage to obtain high frequencies of embryogenic microspores in *Brassica napus*. Physiologia Plantarum, 84, 417-424.
- Telmer, C.A., Newcomb, W., Simmonds, D.H., 1995. Cellular changes during heat shock induction and embryo development of cultured microspores of *Brassica napus* cv. Topas. Protoplasma, 185, 106-112.
- Timmers, A.C.J., Schel, J.H.N., 1991. Localization of cytosolic Ca^{2+} during carrot somatic embryogenesis using confocal scanning laser microscopy. In: Progress in plant growth regulation. (Karssen, C.M., van Loon, L.C., Vreugdenhil, D., -eds.) Kluwer, pp. 347-53, Dordrecht.
- Touraev, A., Vicente, O., Heberle-Bors, E., 1997. Initiation of microspore embryogenesis by stress. Trends in Plant Science, 2, 297-302.
- Touraev, A., Pfosser, M., Heberle-Bors, E., 2001. The microspore: a haploid multipurpose cell. Advances in Botanical Research, 35, 53-109.
- Trottier, M.C., Collin, J., Comeau, A., 1993. Comparison of media for their aptitude in wheat anther culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 35, 59-67.

- Tsay, H.S., 1981. Effects of nitrogen supply to donor plants on pollen embryogenesis in cultured tobacco anthers. *Journal of Agricultural Research of China*, 30, 5-13.
- Turesson, I.K.D., Öhlund, R.C.V., 1993. Plant regeneration through culture of isolated microspores *Triticum aestivum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 34, 163-167.
- TÜİK, 2009. Türkiye İstatistik Kurumu. İnternet Sitesi. <http://www.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul>. Erişim Tarihi: 04.03.2011.
- Van Rensburg, L., Kruger, G.H.J., Kruger, H., 1993. Proline accumulation as drought-tolerance selection criterion: its relationship to membrane integrity and chloroplast ultrastructure in *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Plant Physiology*, 141, 188-194.
- Vasil, I.K., 1980. Androgenic haploids. *International Review of Cytology Supplement*, 11, 195-223.
- Verdus, M.C., Dubois, T., Dubois, J., Vasseur, J., 1993. Ultrastructural changes in leaves of *Cichorium* during somatic embryogenesis. *Annals of Botany*, 11, 375-83.
- Wang, X., Hu, H., 1984. The effect of potato II medium for *Triticale* anther culture. *Plant Science Letters*, 36, 237-239.
- Wang, P., Chen, Y.R., 1986. A study on the application of C17 medium for anther culture. *Acta Botanica Sinica*, 28, 38-45.
- Wang, M., Van Bergen, S., Van Duijn, B., 2000. Insights into a key developmental switch and its importance for efficient plant breeding. *Plant Physiology*, 124, 523-530.
- Wedzony, M., Forster, B.P., Zur, I., Golemić, E., Szechynska-Hebda, M., Dubas, E., Gotebiowska, G., 2009. Progress in doubled haploid technology in higher plants. In: *Advances in haploid production in higher plants*. (Touraev, A., Forster, B.P., Jain, S.M., -eds.) Springer, pp. 1-34, Berlin.
- Wenzel, G., Foroughi-Wehr, B., 1984. Anther culture of cereals and grasses. In: *Cell culture and somatic cell genetics of plants I*. (Vasil, I.K., -ed.) Academic Press, pp. 311-327, New York.
- Wernicke, W., Milkowitz, L., 1987. Effect of auxin on the mitotic cell cycle in culture leaf segments at different stages of development in wheat. *Physiologia Plantarum*, 69, 16-22.

- Whittington, J., Smith, F.A., 1992. Calcium-salinity interactions affect ion transport in *Chara corallina*. *Plant Cell and Environment*, 15, 727-733.
- Wincov, I., 1996. Characterization of rice (*Oryza sativa* L.) plants regenerated from salt-tolerant cell lines. *Plant Science*, 113, 105-111.
- Wojnarowicz, G., Carreda, S., Devaux, P., Sangwan, R., Clément, C., 2004. Barley anther culture: assessment of carbohydrate effects on embryo yield, green plant production and differential plastid development in relation with albinism. *Journal of Plant Physiology*, 161, 747-755.
- Ximing, L., Savaşkan, Ç., Polok, K., Bielawska, I., Szarejko, I., Maluszynski, M., 1994. The effect of media and culture conditions on androgenic response in barley. *Reports Botanic Garden Polish Academy of Science*, 5/6.
- Yancey, P.H., Clark, M.B., Hands, S.C., Bowlus, R.D., Somero, G.N., 1982. Living with water stress: evaluation of osmolyte systems. *Science*, 217, 1214-1222.
- Yazar, S., Karadoğan, T., 2008. Bazı makarnalık buğday genotiplerinin Orta Anadolu bölgesinin taban ve kıraç arazi koşullarında verim ve kalite özelliklerinin belirlenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 3 (2), 32-41.
- Yediay, F.E., 2009. Ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinde 1AL.1RS ve 1BL.1RS çavdar translokasyonları ile cücelik genlerinin araştırılması. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 52s.
- Yeung, E.C., Rahman, M.H., Thorpe, T.A., 1996. Comparative development of zygotic and microspore-derived embryos in *Brassica napus* L. cv. Topas. I. Histodifferentiation. *International Journal of Plant Sciences*, 157, 27-39.
- Zaki, M.A.M., Dickinson, H.G., 1995. Modification of cell development in vitro: the effect of colchicine on anther and isolated microspore culture in *Brassica napus*. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*, 40, 255-270.
- Zapata, F.J., Alejar, M.S., Torrizo, L.B., Novero, A.U., Singh, V.P., Senadhira, D., 1991. Field performance of anther culture derived lines from F crosses of indica rices under saline and non-saline conditions. *Theoretical Applied Genetics*, 83, 6-11.
- Zeberjadi, A.R., Ghasempour, H.R., Soheilikhah, Z., 2010. Effects of drought stress on biochemical and physiological parameters in callus cultures of *Carthamus tinctorius* varieties. *Acta Agronomica Hungarica*, 58 (4), 395-406.
- Zhao, J.P., Simmonds, D.H., Newcomb, W., 1996. Induction of embryogenesis with colchicine instead of heat in microspores of *Brassica napus* L. cv. Topas. *Planta*, 198, 433-439.

- 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.
- Zhou, H., Ball, S.T., Konzak, C.F., 1992. Functional properties of ficoll and their influence on anther culture responses of wheat. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 30, 77-83.
- Ziegler, G., Dressler, K., Hess, D., 1990. Investigations on the anther cultur ability of four german spring wheat cultivars and the influence of light on regeneration of green vs. albino plants. *Plant Breeding*, 105 (1), 40-46.

EK-1

Buğday bitkisi, Gramineae familyasından *Triticum* cinsine ait bir bitkidir. Monokotil bir bitki olan buğday bitkisi, kendi kendini dölleyebilen, kökleri saçaklı, meyvesi karyopsis tipinde olan, tek yıllık bir bitkidir (Seçmen vd., 2000). Her türlü iklim koşullarına uyum gösterebilmesi, hammadde olarak kullanım alanının genişliği ve beslenmede önemli yer tutması nedeniyle, dünyanın her tarafında en çok yetiştirilen tarım ürünleri arasında yer almaktadır.

Buğday bitkisinin, diploid ($2n=14$ kromozomlu), tetraploid ($2n=28$ kromozomlu) ve heksaploid ($2n=42$ kromozomlu) türleri mevcuttur. Kültürü yapılan buğdaylar, diploid buğdaylar; *T. monococcum* ssp. *monococcum* ($2n=14$, AA genomu), iki tetraploid buğday; *T. turgidum* ssp. *durum* ($2n=28$, BBAA genomu) ve *T. timopheevi* ssp. *timopheevi* ($2n=28$, GGAA genomu) ve bir heksaploid buğday; *T. aestivum* ssp. *aestivum* ($2n=42$, BBAAADD) olarak dört grup altında toplanır (Salamini vd., 2002). *Triticum aestivum* L. (ekmeklik buğday) ve *Triticum durum* Desf. (durum buğdayı) ülkemizde yetiştirilen en yaygın buğday türleridir (Davis, 1985).

Buğday, gerek dünyada gerekse Türkiye’de stratejik bir bitki olup, insanların temel enerji ve protein kaynağı durumundadır. Türkiye’de günlük enerji ihtiyacının ortalama % 40’ı buğday ürünleri tarafından karşılanmaktadır. Ülkemizin ekili alanları dikkate alındığında, bu alanların yaklaşık % 50’sini tahıllar, tahılların ekim alanlarının da yaklaşık % 70’ini buğday oluşturmaktadır (Anonim, 2008). Türkiye’de buğdayın 67.650.000 dekar ekim alanı, 16.860.000 ton üretimi ve 251 kg dekara verimi vardır (TÜİK, 2009).

Buğdayın orijin merkezi, Verimli Hilal denen bugünkü İran, Irak, Türkiye, Suriye, Lübnan, İsrail ve Filistin’i kapsayan bölgedir (Salamini vd., 2002). İnsanlar besleyici değeri yüksek olan buğdayı önceleri doğadan toplamışlar ve zaman içerisinde buğdayı kültüre alarak bugünkü duruma getirmişlerdir. Özellikle bu evrimleşme sürecinin hem diploid hem de tetraploid buğday için Güneydoğu Anadolu

bölgesinde, daha özel olarak da Diyarbakır ve çevresinde (Karacadağ), olduğu yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir (Yediy, 2009).

Makarnalık buğdaylar tetraploid bitkiler olup, kalite özellikleri ve kullanım alanları bakımından hexaploid *Triticum aestivum* ve *T. compactum* buğdaylarından çok farklı ve özel bir konuma sahiptir. Makarnalık buğdayların ana kullanım şekli makarna çeşitleridir ve özellikle Avrupa ve Kuzey Amerika ülkelerinde bu amaca yönelik üretilmektedir. Bunun yanında Türkiye, Orta Doğu ve Kuzey Afrika ülkelerini içeren diğer bölgelerde makarna üretimi yanında bulgur, kuskus ve değişik ekmek çeşitlerinin üretiminde de kullanılmaktadır (Liu vd., 1996).

Türkiye’de makarnalık buğday 13.350.000 dekarlık ekim alanı, 3.740.000 tonluk üretimi ve 285 kg dekara verimi ile önemli bir yere sahiptir (TÜİK, 2009). Önemli makarnalık buğday üreticisi ülkelerden biri olan Türkiye’de toplam buğday ekim alanının yaklaşık % 30’unu makarnalık buğday ekim alanı oluştururken, 1990’lı yıllardan sonra bu oran belirgin bir şekilde düşmüş ve 2007 yılında % 15’lere kadar gerilemiştir (Yazar ve Karadoğan, 2008).

Makarnalık buğday Rusya orijinlidir, genel olarak soğuk ve yarı kurak iklimlerde yetiştirilmektedir. En önemli makarnalık buğday yetiştiren ülkeler; A.B.D, Kanada, Rusya, Arjantin, Kuzey Afrika ülkeleri, İtalya, Fransa ve Türkiye’dir. I. ve II. Dünya savaşları sırasında makarnalık buğday ihraç eden en önemli ülkeler Kanada, A.B.D ve Cezayir iken, bugün Avrupa’nın birçok ülkelerinin makarnalık buğday ihtiyacı A.B.D ve Kuzey Afrika ülkeleri tarafından karşılanmaktadır. Makarnalık buğday, kırmızı ve amber renkli olmak üzere iki şekilde değerlendirilmektedir. Kırmızı renkli olanlar, daha çok hayvan yemi olarak kullanılır ve makarna sanayi için bir öneme sahip değildir. Bu çeşit buğdaylar daha çok Arjantin’de yetişmektedir. Amber renginde olanlar ise, makarna sanayinde kullanılmaktadır. En sert buğday amber renkli olanlardır. Protein miktarı çevreye bağlı olarak değişse de genellikle yüksektir. Makarna yapımında yüksek protein istenmektedir. Ancak makarnalık buğdayların proteini ekmeklik buğdaylar kadar uygun değildir. Makarnalık buğdaylarda endospermdeki protein taneleri ve nişasta taneleri şeffaftır. Bu nedenle tane camısı

yapıda gözüktür. Tanenin şeker oranı diğer tür buğdaylara göre daha yüksektir. Fazla miktarda karotenoid pigmenti içermektedir. Makarnalık buğdaylar diğer buğdaylara kıyasla yaklaşık iki kat daha büyük danelidir ve endospermdeki kül miktarı daha yüksektir (Morris, 2004). Danede toplam karbonhidrat oranı % 70 civarındadır. Toplam karbonhidrat içerisinde nişastanın oranı % 90'dan daha fazladır. Danede nişasta dışında selüloz, hemiselüloz ve dekstrinler vardır (Sayaslan, 2007).

Ülke ekonomisinde ve insan beslenmesinde oldukça önemli olan buğday üretimi tarımda uygulanan yanlış politikaların bir sonucu olarak, birim alandan alınan verimin artırılması bir yana, yeni çeşitlerin üreticilere intikal ettirilememesi, hastalık ve zararlılarla yeteri kadar mücadele verilememesi nedeniyle verimde ve kaliteli buğday üretiminde azalma görülmüş, birim alandan alınan buğday verimi dünya ortalamasının altında kalmıştır.

Çizelge 4.1. (devam)

Varyasyon Kaynağı	SD	Anter Cevabı (%)			Kallus oluşumu (%)		
		KT	KO	F değeri	KT	KO	F değeri
TEKERRÜR	2	2.35144	1.17572	0.52 ^{öd}	31.364	15.682	0.206 ^{öd}
GENOTİP	3	918.195	306.065	135.355 ^{**}	9929.679	3309.893	43.478 ^{**}
ÖNİŞLEM	1	83.161	83.161	36.781 ^{**}	1185.617	1185.617	15.574 ^{**}
ÖNİŞLEM x GENOTİP	3	997.455	332.485	127.389 ^{**}	16.000	5333.333	70.057 ^{**}
HATA	14	31.654	2.261	-	1065.792	76.128	-
Genel	23	2032.816	-	-	28212.452	-	-

**0.01, * 0.05, öd önemli değil

SD= Sınıf değeri, KT= Kareler toplamı, KO= Kareler ortalaması

Çizelge 4.1. (devam)

Varyasyon Kaynağı	SD	Yeşil regenerant (%)			Albino regenerant (%)			Toplam Regenerasyon (%)		
		KT	KO	F değeri	KT	KO	F değeri	KT	KO	F değeri
TEKERRÜR	2	19.265	9.632	3.056 ^{öd}	22.851	11.425	3.246 ^{öd}	343.334	171.667	5.325 ^{öd}
GENOTİP	3	99.891	33.297	10.564 ^{**}	13.008	4.336	1.231 ^{öd}	483.456	161.152	4.999 [*]
ÖNİŞLEM	1	1.576	1.576	.500 ^{öd}	13.316	13.316	3.783 ^{öd}	6.834	6.834	.212 ^{öd}
ÖNİŞLEM x GENOTİP	3	7.506	2.502	.794 ^{öd}	2.967	0.989	.281 ^{öd}	16.632	5.544	.172 ^{öd}
HATA	14	44.128	3.152	-	49.280	3.52	-	451.318	32.237	-
Genel	23	172.366	-	-	101.422	-	-	1301.574	-	-

Çizelge 4.1. (devam)

Varyasyon Kaynağı	SD	Yeşil regenerant (%)			Albino regenerant (%)			Toplam Regenerasyon (%)		
		KT	KO	F değeri	KT	KO	F değeri	KT	KO	F değeri
TEKERRÜR	2	0,634	0.317	0.249 ^{öd}	45.996	22.998	0.348 ^{öd}	34.930	17.583	0.42 ^{öd}
NaCl	2	25.480	12.740	9.996 ^{**}	407.751	203.875	3.085 ^{öd}	332.670	166.335	4.101 [*]
GENOTİP x NaCl	6	1176.372	196.062	153.827 ^{**}	97458.384	16243.064	245.786 ^{**}	43084.338	7180.723	172.681 ^{**}
AJANLAR x NaCl	2	54.204	27.102	21.264 ^{**}	52.868	26.434	.040 ^{öd}	1729.716	864.858	20.798 ^{**}
GENOTİP x AJANLAR x NaCl	6	416.352	69.392	54.444 ^{**}	5375.976	895.996	13.558 ^{**}	7255.782	1209.297	29.081 ^{**}
HATA	32	40.768	1.274	-	2114.752	66.086	-	1330.656	41.583	-
Genel	50	1713.81	-	-	105454.751	-	-	53768.092	-	-

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Rağbet Ezgi DURAN

Doğum Yeri ve Yılı: Antakya/1983

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce



Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise: Samandağ Lisesi/1999

Lisans: Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü/2004

Yüksek Lisans: Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü/2007

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:

Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü (2005-2010)

Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü (2010-Devam ediyor)

Yayınları (SCI ve diğer makaleler)

SCI, SSCI ve AHCI tarafından taranan dergilerde yayımlanan teknik not, editöre mektup, tartışma, vaka takdimi ve özet türünden yayınlar dışındaki makale

1. Coskun, Y., Duran, R.E., Savaskan, C., 2010. Influential Effects of Arabinogalactan-proteins on Plant Regeneration Using Calli Derived from Wheat Mature Embryos. African J. of Agricultural Research, 5(17), 2439-2445.
2. Duran, R.E., Coşkun, Y., Savaşkan, Ç., 2011. The Examining of Na-Ca Effect on Some Qualitative and Quantitative Characters in Durum Wheat Plants. African Journal of Biotechnology (Kabul edildi).

SCI, SSCI ve AHCI dışındaki indeks ve özetler tarafından taranan dergilerde yayımlanan teknik not, editöre mektup, tartışma, vaka takdimi ve özet türünden yayınlar dışındaki makale

1. Duran, R.E., Coşkun, Y., Savaşkan, Ç., 2010. Tuzun Makarnalık Buğday Genotiplerinde (*Triticum durum* Desf.) Bazı Kalitatif ve Kantitatif Özellikler Üzerine Etkisi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi,14(1), 17-22.
2. Duran, R.E., Savaşkan, Ç., 2011. Salinity Tolerance of Durum Wheat Genotypes in Androgenesis. Gazi University Journal of Sciences (Kabul edildi).

Alanında, yurtiçinde yayımlanan kitap

1. Çiğdem SAVAŞKAN, Yasemin COŞKUN & Rağbet Ezgi DURAN, 2009. Mikroteknik Dersi Notları ve Uygulama Kılavuzu. ISBN: 978-9944-452-29-8, 78 sayfa, Süleyman Demirel Üniversitesi Yayınları, Isparta.