

Buğdayda Olgun Embriyo Kültürünü Etkileyen Faktörler*

Murat AYDIN **Sevim SAĞSÖZ** **Kamil HALİLOĞLU** **Metin TOSUN**
Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, 25240 ERZURUM (maydin@atauni.edu.tr)

Geliş Tarihi : 19.05.2011

Kabul Tarihi : 29.06.2011

ÖZET: Bu çalışma buğdayda olgun embriyo kültürünü etkileyen faktörleri belirlemek amacıyla yapılmıştır. Kallus, embriyogenik kallus, somatik embriyo oluşumu ve rejenerasyon kapasitesine genotipin, jel yapıcı maddenin, oksin tipleri ve dozlarının etkisi çok önemli olmuştur. Buğday olgun embriyo kültüründe oksin tipi olarak dikambanın, 2,4-D ve pikloramdan, yine jel yapıcı madde olarak phytagelin, ağardan daha etkili olduğu saptanmıştır. En yüksek kallus, embriyogenik kallus ve somatik oluşumu ve de bitki rejenerasyon kapasitesi phytagel ortamındaki dikambanın 4 mg/l dozunda elde edilmiştir. Rejenerasyon ortamının rejenerasyon kapasitesine etkisi çok önemli olmuştur. En yüksek rejenerasyon kapasitesi R1 (0.1 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l BAP) içeren ortamda meydana gelmiştir.

Anahtar kelimeler: Genotip, oksin, jel yapıcı madde, rejenerasyon ortamı, *Triticum aestivum*

Factors Affecting Wheat Mature Embryo Culture

ABSTRACT: This study was carried out to determine the factors affecting wheat mature embryo culture. Effects of genotype, solidifying agents, auxin type and doses were found highly significant on formation of callus, embryogenic callus and regeneration capacity. Dicamba as an auxin type was better than 2,4-D and picloram and phytigel as a solidifying agent was better than agar in wheat mature embryo culture. The highest formation of callus, embryogenic callus and regeneration capacity were observed in medium containing 4 mg/l dicamba solidified with phytigel. Regeneration medium influenced significantly regeneration capacity. The highest regeneration capacity (R1) was observed in medium containing 1 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l BAP.

Key words: Genotype, auxin, solidifying agent, regeneration medium, *Triticum aestivum*

GİRİŞ

Buğdayda gen aktarım çalışmaları kallus oluşumu ve bitki rejenerasyon sistemine bağlıdır. Buğdayda kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonunda başarının büyük ölçüde genotipe bağlı olduğu bilinmektedir (Şehirli ve Özgen, 1998). Bunun yanında, donör bitkinin yetiştirme koşulları (Hess ve Carman, 1998), kültür ortamı (Fennel vd., 1996; Mathias ve Simpson, 1986, Elena ve Ginzo, 1988) ve eksplant kaynağı (Ozias-Akins ve Vasil, 1982; Redway vd., 1990) başarıyı etkilemektedir. Buğdayda, gen aktarımında önemli bir aşama olan somatik kallus kültürü için eksplant kaynağı olarak **olgunlaşmamış embriyolar** (Bahieldin vd., 2000 ; Bohorova, 2001; Li vd., 2003; Haliloglu ve Baenziger, 2003a; Haliloglu ve Baenziger, 2005), **yaprak segmentleri** (Haliloglu, 2006), **olgunlaşmamış çiçek durumu** (Ozias- Akins ve Vasil 1982; Redway vd. 1990), **olgun embriyolar** (Delporte vd., 2001; Mendoza ve Kaeppler, 2002; Patnaik ve Khurana, 2003; Li vd., 2003; Zale vd., 2004; Filippov vd., 2006; Bı vd., 2007), **mezokotil** (Yurkova vd., 1982), **tohumlar** (Shah vd., 2003), **apikal meristemler** (McHughen, 1983), **sürgün ucu** (Viertel ve Hess, 1996) ve **anterler** (Ingram vd., 2000, Haliloglu ve Baenziger, 2003b) kullanılmıştır.

Yukarıda belirtilen eksplant kaynakları içerisinde en yüksek kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu olgunlaşmamış embriyo kültürlerinde görülmüştür (Filippov vd., 2006). Bu nedenle, buğdayda olgunlaşmamış embriyolar kallus kültüründe etkili bir rejenerasyon için en iyi eksplant kaynağını

oluşturmaktadır (Redway vd., 1990; Özgen vd., 1996; Özgen vd., 1998; Mendoza ve Kaeppler, 2002; Patnaik ve Khurana, 2003; Zale vd., 2004).

Olgunlaşmamış embriyoların eksplant kaynağı olarak kullanılabilmesi için donör bitkiden sadece belli dönemde (antesinden 13-15 gün sonra) eksplant temin edilmesi ve kışlık çeşitlerde vernalizasyon ihtiyacının karşılanması için seralara ve kontrollü koşullara gereksinim duyulmaktadır. Bu durumda daha uzun bir süre ve daha fazla finansman gerekmektedir. Buna karşın, olgun embriyoların kaynağı olan tohumlar kolaylıkla temin edilebildikleri ve depolanabildikleri için yılın her döneminde çalışma olanağı sağlamaktadırlar. Ancak, Olgun embriyolar eksplant kaynağı olarak kullanıldıklarında kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu düşük olmaktadır. Bununla beraber tohumlardan direkt elde edilen olgun embriyolar (Delporte vd., 2001; Mendoza ve Kaeppler, 2002; Patnaik ve Khurana, 2003; Li vd., 2003; Zale vd., 2004), endosperm destekli olgun embriyolar (Özgen vd., 1998; Filippov vd., 2006) ince olgun embriyo parçaları (Delporte vd., 2001) kallus oluşturma ve bitki rejenerasyonu için eksplant olarak kullanılmaktadır.

Buğdayda yapılan birçok çalışmada somatik embriyogenesis oluşumunu teşvik etmek için en fazla kullanılan oksin tipi 2,4-D (2,4-Diklorofenoksi asetik asit)'dir. Bunun yanında pikloram (4-amino-3,5,6-trikloro pikolinik asit) ve dikamba (3,6-Diklorobenzoik asit) gibi oksinler de tek başlarına

*Bu makalede yüksek lisans tezinin sonuçları kullanılmıştır. Araştırma Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri yönetim birimi tarafından desteklenmiştir.

veya 2,4-D ile birlikte kullanılmaktadırlar. Buğday olgun embriyo kültürüne ait yapılan birkaç çalışmada kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonunda dikambanın 2,4-D'den üstün olduğu kaydedilmiştir (Mendoza ve Kaepler, 2002; Filippov vd., 2006). Buğdayda olgunlaşmamış embriyo kültürü konusunda yapılan bir çalışmada embriyogenik kallus oluşturma ve bitki rejenerasyonu bakımından dikambanın 2,4-D ve piklorama göre daha iyi olduğu tespit edilmiştir (Satyavathi vd., 2004). Yine, çavdarda yapılan bir denemede embriyogenesiste dikambanın 2,4-D ve NAA (Naftalen asetik asit) göre daha etkili olduğu saptanmıştır (Ma ve Pulli, 2004).

Besin ortamını yarı katı hale getirmek için jel yapıcı maddeler kullanılmaktadır. Jel yapıcı madde olarak en çok kullanılanlar agar (değişik tipleri) ve phytagedir (gelrite) (Babaoğlu vd., 2001). Buğday olgun embriyo kültüründe jel yapıcı maddenin etkisine ait literatür bilgisi yoktur. Ancak, buğdayda olgunlaşmamış embriyo ve anter kültüründe farklı firmalara ait agarları karşılaştıran Simonson ve Baenzinger (1992) jel yapıcı maddelerin kallus oluşumuna etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışmada ekmeçlik buğday genotiplerinin, oksin tipi ve dozları ile jel yapıcı maddelerin ekmeçlik buğdayda olgun embriyo kültürüne olan etkileri belirlenmiştir.

MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada 4 ekmeçlik buğday genotipinin (Gerek 79, Haymana 79, Sivas 111/33 ve Kırık) olgunlaşmış embriyoları eksplant olarak kullanılmıştır. Tohumlar musluk suyunda yıkandıktan sonra %70'lik etil alkolde 5 dakika karıştırılarak 3 defa steril saf su ile yıkanmıştır. Daha sonra birkaç damla Tween 20 (Sigma) içeren %1'lik sodyum hipokloritte 20 dakika karıştırılmıştır. Yüzey sterilizasyonu yapılan tohumlar steril saf su ile yıkandıktan sonra 3 saat steril saf su içerisinde 25°C'de karanlıkta bekletilmiş ve olgun embriyolar çıkartılmıştır.

Kallus oluşumu için olgun embriyolar 3 farklı oksin tipinin (2,4-D, dikamba ve pikloram), 3 farklı dozunu (2.5, 3.0 ve 4.0 mg/l) ve 2 farklı jel yapıcı [phytagel (2 g/l) ve agar (8 g/l)] maddeyi içeren MS (Murashige ve Skoog, 1962) ortamında 25±1°C'de ve karanlıkta 4 hafta süreyle kültüre alınmıştır. MS tuzları ve vitaminlerine ilave olarak 20 g sakkaroz, 0.75 g MgCl₂ (magnezyum klorür), 0.5 g/l L-glutamin, 0.1 g/l kazein hidrolizat, 100 mg askorbik asit ve 1.95 g/l MES kullanılmıştır. Ortamın pH'sı NaOH (Sodyum hidroksit) ile 5.8 ayarlanmıştır. Besi ortamları, sterilizasyon için otoklavda 15 dakika boyunca 105 kPa basınçta 121°C'de tutulmuştur. Sıcakta bozulan vitaminler ve bitki büyüme düzenleyicileri için 0.22 µm poroziteli selüloz nitrat filtreler (milipor) kullanılmıştır. Dört hafta sonunda

kallus oluşumu (%) (KO) [$KO\% = (\text{Oluşan kallus sayısı}/\text{Eksplant sayısı}) \times 100$], embriyogenik kallus oluşumu (EKO) (%) [$EKO\% = (\text{Oluşan Embriyogenik kallus sayısı}/\text{Eksplant sayısı}) \times 100$] ve somatik embriyo sayısı (SES) (adet) [$SES = \text{Oluşan somatik embriyo sayısı}/\text{Embriyogenik kallus sayısı}$] belirlenmiştir.

Meydana gelen kalluslar, bitki rejenerasyonu için 0.1 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l BAP (6- Benzil amino pürin) (R1) veya 0.2 mg/l 2,4-D (R2) içeren MS ortamına aktarılmış ve 25±1°C'de 16:8 saat aydınlık: karanlık fotoperiyotta 4 hafta süreyle bekletilmiştir. Aydınlatma kaynağı olarak floresan lambası (62 µmol/m²s) kullanılmıştır. Bitki rejenerasyon ortamında MS ortamına ilave olarak 20 g sakkaroz, 2 g/l phytagedir, 100 mg askorbik asit ve 1.95g/l MES kullanılmıştır. Dört hafta sonunda rejenerasyon kapasitesi (RK) (%) [$RK\% = (\text{Rejenere olan embriyogenik kallus sayısı}/\text{Embriyogenik kallus sayısı}) \times 100$] belirlenmiştir.

Çalışma tam şansa bağlı deneme planına göre 4 tekrarlı olarak yürütülmüştür. Her petri bir tekerrür olarak kabul edilmiş ve her petri kutusuna 20 adet olgun embriyo bırakılmıştır. Kallus, embriyogenik kallus oluşumu ve somatik embriyo sayısına ilişkin hesaplanan veriler 4x3x3x2 (4 genotip x 3 oksin tipi x 3 oksin dozu x 2 jel yapıcı madde) faktöriyel düzende varyans analizine (ANOVA) tabi tutulmuştur. Ayrıca yukarıdaki faktörlere ilave olarak rejenerasyon ortamının (R1: 0.1mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l BAP ve R2: 0.2 mg/l 2,4-D) rejenerasyon kapasitesine olan etkileri de incelenmiş ve elde edilen sonuçlara 4x3x3x2x2 (4 genotip x 3 oksin tipi x 3 oksin dozu x 2 jel yapıcı madde x 2 rejenerasyon ortamı) faktöriyel düzende varyans analizi uygulanmıştır. İstatistiksel olarak önemli bulunan parametrelere ait ortalamalar arasındaki farklar LSD çoklu karşılaştırma testi ile $P < 0.05$ seviyesinde belirlenmiştir.

BULGULAR

Kallus oluşumu

Eksplantlar kültüre alındıktan yaklaşık 5 gün sonra kallus oluşumunun başladığı görülmüştür (Şekil 1a). Kallus oluşumu üzerine, genotipin, jel yapıcı maddenin, oksin tipinin ana etkisi çok önemli ($p = 0.001$) olurken, oksin dozunun ana etkisi önemli ($p = 0.039$) olmuştur. Kırık %92.0'lik kallus oluşumu ile en yüksek, Haymana 79 ise %81.5 ile en düşük kallus oluşum oranına sahip olmuşlardır. Bu oran, Gerek 79'da %89.5, Sivas 111/33'de %88.1 olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.1).

Ortalama kallus oluşum oranı phytagede %89.0 iken, agarda %86.5 olmuştur. Genotiplerin kallus oluşum oranlarının jel yapıcı maddeye göre farklılık göstermesi, genotip x jel yapıcı madde interaksiyonunun önemli ($p=0.014$) çıkmasına neden

olmuştur. Tüm çeşitlerde en yüksek kallus oluşumu phytagelde meydana gelmiş ve jel yapıcı maddeye en fazla tepki Haymana 79 genotipinde gözlenmiştir (Çizelge 3.1).

Oksin tiplerine göre kallus oluşum oranları karşılaştırıldığında, %94.8 ile dikamba ilk sırada yer almış bunu azalan sıra ile 2,4-D (%90.7) ve pikloram (%77.8) izlemiştir (Çizelge 3.1). Oksin tiplerinin dozlara göre farklılık göstermesi, oksin tipi x doz interaksyonunun çok önemli ($p=0.001$) çıkmasına

neden olmuştur. Her oksin tipi için dozlar karşılaştırıldığında dikamba ve pikloramın 4 mg/l dozunda en yüksek (sırasıyla %96.9 ve %80.9), 2.5 mg/l dozunda ise en düşük (sırasıyla %93.1 ve %75.8) kallus oluşum oranı gözlenmiştir. Buna karşın, 2,4-D'nin kullandığı ortamlarda kallus oluşumu 3 mg/l dozda en yüksek (%93.6), 4 mg/l dozda ise en düşük (%86.7) oranda gerçekleşmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Farklı jel yapıcı madde, oksin tipleri ve dozlarında genotiplerin kallus oluşumu üzerine etkisi (%).

Jel Yapıcı Madde	Oksin Tipi	Doz (mg/l)	Gerek 79	Haymana 79	Kırık	Sivas 111/33	ORTALAMA
Agar	2,4-D	2.5	92.5	81.3	95.0	91.3	90.0
		3.0	95.0	85.0	96.3	93.8	92.5
		4.0	88.8	77.5	87.5	85.0	84.7
		<i>Ortalama</i>	<i>92.1</i>	<i>81.3</i>	<i>93.0</i>	<i>90.0</i>	<i>89.1</i>
	Dikamba	2.5	95.0	83.8	95.0	93.8	91.9
		3.0	96.3	85.0	97.5	95.0	93.4
		4.0	97.5	90.0	100	96.3	95.9
		<i>Ortalama</i>	<i>96.3</i>	<i>86.3</i>	<i>97.5</i>	<i>95.0</i>	<i>93.7</i>
	Pikloram	2.5	75.0	68.8	81.3	75.0	75.0
		3.0	77.5	66.3	80.0	77.5	75.3
		4.0	80.0	72.5	86.3	81.3	80.0
		<i>Ortalama</i>	<i>77.5</i>	<i>69.2</i>	<i>82.5</i>	<i>77.9</i>	<i>76.8</i>
	ORTALAMA			88.6	78.9	91.0	87.6
Phytigel	2,4-D	2.5	95.0	87.5	97.5	93.8	93.5
		3.0	97.5	88.8	98.8	93.8	94.7
		4.0	91.3	85.0	91.3	87.5	88.8
		<i>Ortalama</i>	<i>94.6</i>	<i>87.1</i>	<i>95.8</i>	<i>91.7</i>	<i>92.3</i>
	Dikamba	2.5	96.3	91.3	96.3	93.8	94.4
		3.0	97.5	91.3	98.8	95.0	95.6
		4.0	98.8	95.0	100.0	97.5	97.8
		<i>Ortalama</i>	<i>97.5</i>	<i>92.5</i>	<i>98.3</i>	<i>95.4</i>	<i>95.9</i>
	Pikloram	2.5	75.0	71.3	83.8	76.3	76.6
		3.0	78.8	71.3	83.8	77.5	77.8
		4.0	83.8	75.0	87.5	81.3	81.8
		<i>Ortalama</i>	<i>79.2</i>	<i>72.5</i>	<i>85.0</i>	<i>78.3</i>	<i>78.8</i>
	ORTALAMA			90.4	84.0	93.1	88.5
Jel yapıcı maddelerin ortalaması	2,4-D	2.5	93.8	84.4	96.3	92.5	91.7
		3.0	96.3	86.8	97.5	93.8	93.6
		4.0	90.0	81.3	89.4	86.3	86.7
		<i>Ortalama</i>	<i>93.3</i>	<i>84.2</i>	<i>94.4</i>	<i>90.8</i>	<i>90.7</i>
	Dikamba	2.5	95.6	87.5	95.6	93.8	93.1
		3.0	96.9	88.1	98.1	95.0	94.5
		4.0	98.1	92.5	100	96.9	96.9
		<i>Ortalama</i>	<i>96.9</i>	<i>89.4</i>	<i>97.9</i>	<i>95.2</i>	<i>94.8</i>
	Pikloram	2.5	75.0	70.0	82.5	75.6	75.8
		3.0	78.1	68.8	81.9	77.5	76.6
		4.0	81.9	73.8	86.9	81.3	80.9
		<i>Ortalama</i>	<i>78.3</i>	<i>70.8</i>	<i>83.8</i>	<i>78.1</i>	<i>77.8</i>
	ORTALAMA			89.5	81.5	92.0	88.1
Jel yapıcı maddelerin ve oksin tiplerinin ortalaması	2.5	88.1	80.6	91.5	87.3	86.8	
	3.0	90.4	81.3	92.5	88.8	88.2	
	4.0	90.0	82.5	92.1	88.1	88.2	
GENEL ORTALAMA			89.5	81.5	92.0	88.1	

Not: VK = %4.2; Genotip $LSD_{(0.05)} = 1.4$; Oksin tipi $LSD_{(0.05)} = 1.2$; Oksin dozu $LSD_{(0.05)} = 1.2$; Jel yapıcı madde x genotip $LSD_{(0.05)} = 1.9$; Oksin tipi x oksin dozu $LSD_{(0.05)} = 2.0$

Kallus oluşum oranı bakımından jel yapıcı madde, oksin tipi ve dozunun genotipler üzerine olan etkileri incelendiğinde en yüksek kallus oluşum oranı, Haymana 79 (%95.0), Gerek 79 (%98.8) ve Sivas 111/33 (%97.5) genotiplerinde phytigel ortamındaki dikambanın 4 mg/l dozunda elde edilmiş, Kırık genotipinde (%100) ise agar ve phytigel ortamındaki dikambanın 4 mg/l dozunda kaydedilmiştir (Çizelge 3.1).

Embriyogenik kallus oluşumu

Sert dokulu, dağılılabılır özellikte, sıkı yapılı ve

krem renkli kalluslar embriyogenik kallus (Şekil 1b), beyaz ve sulu yapılı kalluslar ise embriyogenik olmayan kallus (Şekil 1c) olarak değerlendirilmiştir.

Embriyogenik kallus oluşumuna genotipin, jel yapıcı maddenin, oksin tipinin ve dozunun ana etkisi çok önemli ($p = 0.001$) olmuştur. Embriyogenik kallus oluşum oranları yönünden genotipler karşılaştırıldıklarında, Kırık %88.6'lık EKO ile ilk sırada yer almış, bunu sırasıyla Gerek 79 (%86.6), Sivas 111/33 (%83.6) ve Haymana 79 (%75.1) genotipleri izlemiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Farklı jel yapıcı madde, oksin tipleri ve dozlarında genotiplerin embriyogenik kallus oluşumu üzerine etkisi (%).

Jel Yapıcı Madde	Oksin Tipi	Doz (mg/l)	Gerek 79	Haymana 79	Kırık	Sivas 111/33	ORTALAMA
Agar	2,4-D	2.5	91.3	75.0	90.0	86.3	85.6
		3.0	93.8	77.5	95.0	88.8	88.8
		4.0	85.0	71.3	81.3	80.0	79.4
		<i>Ortalama</i>	<i>90.0</i>	<i>74.6</i>	<i>88.8</i>	<i>85.0</i>	84.6
	Dikamba	2.5	93.8	80.0	91.3	88.8	88.4
		3.0	95.0	80.0	96.3	93.8	91.3
		4.0	97.5	86.3	98.8	93.8	94.1
		<i>Ortalama</i>	<i>95.4</i>	<i>82.1</i>	<i>95.4</i>	<i>92.1</i>	91.3
	Pikloram	2.5	67.5	60.0	78.8	63.8	67.5
		3.0	72.5	58.8	75.0	71.3	69.4
		4.0	75.0	65.0	81.3	75.0	74.1
		<i>Ortalama</i>	<i>71.7</i>	<i>61.3</i>	<i>78.3</i>	<i>70.0</i>	70.3
ORTALAMA			85.7	72.6	87.5	82.4	82.0
Phytigel	2,4-D	2.5	92.5	81.3	92.5	88.8	88.8
		3.0	96.3	82.5	96.3	91.3	91.6
		4.0	87.5	78.8	88.8	82.5	84.4
		<i>Ortalama</i>	<i>92.1</i>	<i>80.8</i>	<i>92.5</i>	<i>87.5</i>	88.2
	Dikamba	2.5	95.0	83.8	93.8	90.0	90.6
		3.0	96.3	86.3	96.3	93.8	93.1
		4.0	98.8	87.5	100.0	96.3	95.6
		<i>Ortalama</i>	<i>96.7</i>	<i>85.8</i>	<i>96.7</i>	<i>93.3</i>	93.1
	Pikloram	2.5	68.8	65.0	77.5	67.5	69.7
		3.0	73.8	63.8	78.8	76.3	73.1
		4.0	78.8	68.8	83.8	77.5	77.2
		<i>Ortalama</i>	<i>73.8</i>	<i>65.8</i>	<i>80.0</i>	<i>73.8</i>	73.3
ORTALAMA			87.5	77.5	89.7	84.9	84.9
Jel yapıcı maddelerin ortalaması	2,4-D	2.5	91.9	78.1	91.3	87.5	87.2
		3.0	95.0	80.0	95.6	90.0	90.2
		4.0	86.3	75.0	85.0	81.3	81.9
		<i>Ortalama</i>	<i>91.0</i>	<i>77.7</i>	<i>90.6</i>	<i>86.3</i>	86.4
	Dikamba	2.5	94.4	81.9	92.5	89.4	89.5
		3.0	95.6	83.1	96.3	93.8	92.2
		4.0	98.1	86.9	99.4	95.0	94.8
		<i>Ortalama</i>	<i>96.0</i>	<i>84.0</i>	<i>96.0</i>	<i>92.7</i>	92.2
	Pikloram	2.5	68.1	62.5	78.1	65.6	68.6
		3.0	73.1	61.3	76.9	73.8	71.3
		4.0	76.9	66.9	82.5	76.3	75.6
		<i>Ortalama</i>	<i>72.7</i>	<i>63.5</i>	<i>79.2</i>	<i>71.9</i>	71.8
GENEL ORTALAMA			86.6	75.1	88.6	83.6	
Jel yapıcı maddelerin ve oksin tiplerinin ortalaması		2.5	84.8	74.2	87.3	80.8	81.8
		3.0	87.9	74.8	89.6	85.8	84.5
		4.0	87.1	76.3	89.0	84.2	84.1

Not: VK= %5.03; Genotip $LSD_{(0.05)} = 1.4$; Oksin tipi $LSD_{(0.05)} = 1.2$; Oksin dozu $LSD_{(0.05)} = 1.2$; Oksin tipi x genotip $LSD_{(0.05)} = 2.4$; Oksin tipi x oksin dozu $LSD_{(0.05)} = 2.1$

Embriyogenik kallus oluşumu bakımından oksin tipleri karşılaştırıldığında dikamba %92.2 ile ilk sırada yer almış, bunu %86.4 ile 2,4-D ve %71.8 ile pikloram izlemiştir (Çizelge 3.2). Genotiplerin EKO değerinin oksin tiplerine göre farklılık göstermesi, genotip x oksin tipi interaksyonunun çok önemli ($p=0.02$) çıkmasına sebep olmuştur. Tüm çeşitlerde en yüksek EKO dikambada, en düşük ise pikloramda meydana gelmiştir. Yine, oksin tiplerinin EKO üzerine etkileri dozlara göre değiştiği için oksin tipi x doz interaksyonu istatistiksel anlamda çok önemli ($p=0.001$) olmuştur. EKO bakımından her oksin tipi için dozlar değerlendirildiğinde en yüksek EKO dikamba ve pikloramda 4 mg/l dozda (sırasıyla %94.8 ve %75.6), 2,4-D'de ise 3 mg/l dozda (%90.2) meydana gelmiştir. Buna karşın en düşük EKO ise dikamba ve pikloramda 2.5 mg/l dozda (sırasıyla %89.5 ve %68.6), 2,4-D'de ise 4 mg/l dozda (%81.9) olmuştur. Diğer taraftan EKO bakımından jel yapıcı maddeler karşılaştırıldığında EKO phytagelde %84.9, agarda ise %82.0 olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.2).

Araştırmada kullanılan tüm genotiplerde en yüksek EKO phytagel ortamında dikambanın 4 mg/l dozunda meydana gelmiştir. Bu oran, Kırık'de %100, Gerek 79'da %98.8, Sivas 111/33'de %96.3 ve Haymana 79'da %87.5 olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.2).

Somatik embriyo sayısı

Embriyogenik kallus oluşumunda olduğu gibi somatik embriyo sayısına genotipin, jel yapıcı maddenin, oksin tipinin ve dozunun ana etkisi çok önemli ($p = 0.001$) olmuştur. En yüksek somatik embriyo oluşumu 8.5 adet ile Gerek 79 buğday genotipinde meydana gelmiştir. Bunu sırasıyla 8.2 adet ile Kırık, 8.1 adet ile Sivas 111/33 ve 7.1 adet ile Haymana 79 genotipleri izlemiştir (Çizelge 3.3).

Somatik embriyo sayısı oksin tipleri bakımından karşılaştırıldığında en yüksek dikambada (9.6 adet) saptanmış, bunu 9.5 adet ile 2,4-D ve 5.0 adet ile pikloram izlemiştir. Diğer taraftan Somatik embriyo sayısı, phytagelde 8.2 adet, agarda ise 7.8 adet olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.3). Jel yapıcı madde x oksin tipi ve jel yapıcı madde x oksin tipi x doz interaksyonları istatistiksel anlamda önemli (sırasıyla $p = 0.032$, $p = 0.040$), oksin x doz interaksyonu ise çok önemli ($p = 0.001$) olmuştur.

Her iki jel yapıcı maddeye göre oksin tipleri karşılaştırıldığında en yüksek SEO agar ortamında dikambada (9.3 adet), phytagelde ise dikamba ve 2,4-D'de (9.8 adet) tespit edilmiştir. Yine, her oksin tipi için dozlar değerlendirildiğinde en yüksek somatik embriyo oluşumu dikamba ve pikloramda 4 mg/l

dozda (sırasıyla 10.1 ve 5.7 adet), 2,4-D'de ise 3 mg/l dozda (9.7 adet) meydana gelmiştir. En düşük somatik embriyo oluşumu ise dikamba ve pikloramda 2.5 mg/l dozda (sırasıyla 8.8 ve 4.3 adet) gözlenirken, 2,4-D'de 4 mg/l dozda (9.3 adet) tespit edilmiştir (Çizelge 3.3).

Somatik embriyo oluşumu bakımından agar ve phytagel içeren ortamlarda her oksin tipi için dozlar karşılaştırıldığında, agar içeren ortamda en yüksek somatik embriyo sayısı dikamba ve pikloramda 4 mg/l dozda (sırasıyla 9.7 ve 5.6 adet), 2,4-D'de ise 2.5 mg/l dozda (9.4 adet) belirlenmiştir. Phytagel içeren ortamda ise dikamba ve pikloramda 4 mg/l dozda (sırasıyla 10.5 ve 5.8 adet), 2,4-D'de ise 3 mg/l dozda (10.2 adet) belirlenmiştir.

Çizelge 3.3 incelendiğinde en yüksek SEO, Kırık (10.7 adet) ve Sivas (10.6 adet) genotiplerinde phytagel ortamında dikambanın 4 mg/l dozunda, Haymana 79'da (9.2 adet) phytagel ortamında 2,4-D'nin 3 mg/l dozunda, Gerek 79'da (10.8 adet) ise dikambanın 3 mg/l dozunda en yüksek somatik embriyo oluşumu saptanmıştır.

Rejenerasyon kapasitesi

Yeşil noktacıklara sahip embriyogenik kalluslar rejenerasyon kapasitesine sahip embriyogenik kalluslar olarak değerlendirilmiştir. Rejenerasyon kapasitesi üzerine varyasyon kaynaklarının tamamının etkisi çok önemli olmuştur ($p<0.01$). Diğer taraftan varyasyon kaynakları arasındaki interaksyonlar önemsiz bulunmuştur ($p>0.05$).

Rejenerasyon kapasitesi bakımından genotipler karşılaştırıldığında Sivas 111/33 genotipi %78.7'lik rejenerasyon kapasitesi ile en yüksek değere sahip olurken, Haymana 79 genotipi %71.5'lik değer ile en düşük rejenerasyon kapasitesine sahip olmuştur. Bu oran Kırık'te %77.7, Gerek 79'da ise %74.1 olarak kaydedilmiştir (Çizelge 3.4).

Rejenerasyon ortamı olarak **R1** (0.1 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l BAP) ve **R2** (0.2 mg/l 2,4-D) ortamları kullanılmıştır. Rejenerasyon kapasitesi bakımından rejenerasyon ortamları karşılaştırıldığında rejenerasyon kapasitesi R1 ortamında %76.5 olurken, R2'de %74.5 olmuştur (Çizelge 3.4) (Şekil 1d). Diğer taraftan, oksin tiplerinin rejenerasyon kapasitesine olan etkileri incelendiğinde dikamba %88.5'lik rejenerasyon kapasitesi ile ilk sırada yer almış, bu oran 2,4-D'de %86.5 ve pikloramda %51.9 olarak belirlenmiştir. Yine, jel yapıcı maddeler karşılaştırıldığında rejenerasyon kapasitesi phytagelde %76.2 iken, agarda %74.8 olmuştur (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.3. Farklı jel yapıcı madde, oksin tipleri ve dozlarında genotiplerin somatik embriyo sayısı üzerine etkisi (adet).

Jel Yapıcı Madde	Oksin Tipi	Doz (mg/l)	Gerek 79	Haymana 79	Kırık	Sivas 111/33	ORTALAMA
Agar	2,4-D	2.5	9.9	8.6	9.5	9.6	9.4
		3.0	9.7	7.8	9.4	9.6	9.1
		4.0	9.4	7.9	9.2	9.4	9.1
		<i>Ortalama</i>	<i>9.7</i>	<i>8.1</i>	<i>9.4</i>	<i>9.5</i>	9.2
	Dikamba	2.5	8.5	7.5	8.9	9.1	8.5
		3.0	10.0	8.4	9.7	9.7	9.5
		4.0	10.1	8.7	10.1	9.9	9.7
		<i>Ortalama</i>	<i>9.5</i>	<i>8.2</i>	<i>9.6</i>	<i>9.6</i>	9.3
	Pikloram	2.5	4.5	3.9	4.3	4.0	4.2
		3.0	5.6	4.1	5.0	5.0	5.0
		4.0	5.9	4.8	5.5	5.7	5.6
		<i>Ortalama</i>	<i>5.3</i>	<i>4.3</i>	<i>5.0</i>	<i>4.9</i>	5.0
	ORTALAMA			8.2	6.9	8.0	8.0
Phytigel	2,4-D	2.5	10.2	9.1	10.1	10.0	9.8
		3.0	10.4	9.2	10.6	10.5	10.2
		4.0	10.2	8.0	9.7	9.0	9.4
		<i>Ortalama</i>	<i>10.3</i>	<i>8.9</i>	<i>10.1</i>	<i>9.9</i>	9.8
	Dikamba	2.5	9.6	7.6	9.4	9.6	9.1
		3.0	10.8	8.7	10.6	9.5	10.0
		4.0	11.2	9.0	10.7	10.6	10.5
		<i>Ortalama</i>	<i>10.5</i>	<i>8.4</i>	<i>10.2</i>	<i>9.9</i>	9.8
	Pikloram	2.5	4.0	3.9	5.1	4.9	4.4
		3.0	5.3	4.3	5.0	4.6	4.9
		4.0	6.5	4.8	5.7	5.5	5.8
		<i>Ortalama</i>	<i>5.3</i>	<i>4.3</i>	<i>5.3</i>	<i>5.0</i>	5.0
	ORTALAMA			8.7	7.2	8.5	8.2
Jel yapıcı maddelerin ortalaması	2,4-D	2.5	10.0	8.9	9.8	9.8	9.6
		3.0	10.1	8.6	10.0	10.1	9.7
		4.0	9.8	8.0	9.5	9.2	9.3
		<i>Ortalama</i>	<i>10.0</i>	<i>8.5</i>	<i>9.7</i>	<i>9.7</i>	9.5
	Dikamba	2.5	9.0	7.6	9.2	9.4	8.8
		3.0	10.4	8.5	10.2	9.6	9.8
		4.0	10.8	8.8	10.4	10.3	10.1
		<i>Ortalama</i>	<i>10.1</i>	<i>8.3</i>	<i>9.9</i>	<i>9.8</i>	9.6
	Pikloram	2.5	4.3	3.9	4.6	4.5	4.3
		3.0	5.4	4.2	5.0	4.8	4.9
		4.0	6.2	4.8	5.6	5.6	5.7
		<i>Ortalama</i>	<i>5.3</i>	<i>4.3</i>	<i>5.2</i>	<i>5.0</i>	5.0
	ORTALAMA			8.5	7.1	8.2	8.1
Jel yapıcı maddelerin ve oksin tiplerinin ortalaması	2.5	7.8	6.8	7.9	7.9	7.6	
	3.0	8.7	7.1	8.4	8.2	8.1	
	4.0	8.9	7.2	8.5	8.4	8.3	
GENEL ORTALAMA			8.5	7.1	8.2	8.1	8.1

Not: VK = %27.6; Genotip $LSD_{(0.05)} = 0.2$; Oksin tipi $LSD_{(0.05)} = 0.2$; Oksin dozu $LSD_{(0.05)} = 0.2$; Jel yapıcı madde x oksin tipi $LSD_{(0.05)} = 0.3$; Oksin tipi x oksin dozu $LSD_{(0.05)} = 0.3$; Jel yapıcı madde x oksin tipi x oksin dozu $LSD_{(0.05)} = 0.4$

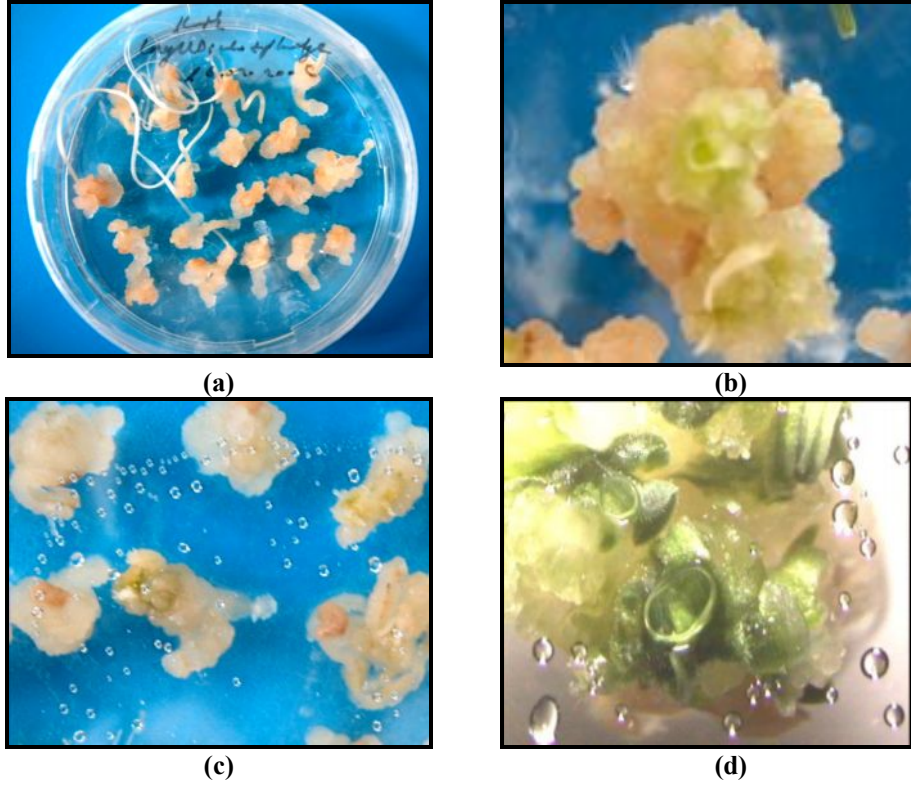
Çizelge 3.4'deki veriler incelendiğinde, en yüksek rejenerasyon kapasitesinin jel yapıcı madde olarak phytagelin, oksin tipi olarak dikambanın 4 mg/l dozunun kullanıldığı R1 ortamında (0.1 mg/l

2,4-D + 0.5 mg/l BAP) Sivas 111/33 genotipine (%97.4) ait olduğu görülmektedir. Bu oran Kırık genotipinde %92.5, Gerek 79 genotipinde %89.7 ve Haymana 79 genotipinde %88.7 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.4. Farklı varyasyon kaynaklarının ve farklı rejenerasyon ortamı, jel yapıcı madde, oksin tipleri ve dozlarında çeşitlerin rejenerasyon kapasiteleri (RK)%.

Varyasyon Kaynakları				Açıklama				RK (%)			
Genotip				Gerek 79				74.1			
				Haymana 79				71.5			
				Kırık				77.7			
				Sivas 111/33				78.7			
Rejenerasyon ortamı				R1				76.5			
				R2				74.5			
Jel yapıcı madde				Agar				74.8			
				phytagel				76.2			
Oksin Tipi				2,4-D				86.0			
				Dikamba				88.5			
				Pikloram				51.9			
Oksin Dozu (mg/l)				2.5				73.7			
				3.0				76.8			
				4.0				75.9			
Rejenerasyon ortamı	Jel Yapıcı Madde	Oksin Tipi	Doz (mg/l)	Gerek 79	Haymana 79	Kırık	Sivas 111/33				
R1	Agar	2,4-D	2.5	85.4	83.3	86.1	91.2				
			3.0	86.8	77.5	89.2	91.7				
			4.0	85.3	79.3	84.7	87.5				
		Dikamba	2.5	86.8	84.4	86.4	91.7				
			3.0	84.2	83.8	89.5	92.1				
			4.0	89.7	82.8	89.9	94.7				
		Pikloram	2.5	51.6	45.8	50.0	50.0				
			3.0	51.7	54.2	73.9	53.6				
			4.0	53.3	50.0	51.5	53.3				
		Phytigel	2,4-D	2.5	86.4	81.8	89.2	94.4			
				3.0	89.5	84.9	92.5	94.6			
				4.0	88.6	84.4	86.1	91.0			
	Dikamba		2.5	84.2	85.3	89.5	94.4				
			3.0	89.5	88.7	94.7	94.6				
			4.0	89.7	88.7	92.5	97.4				
	Pikloram		2.5	46.4	45.0	51.5	51.9				
			3.0	50.0	53.8	54.8	56.7				
			4.0	53.1	50.0	61.8	58.1				
	R2		Agar	2,4-D	2.5	81.6	80.0	86.1	85.8		
					3.0	83.8	80.6	86.8	88.6		
					4.0	79.4	82.1	84.4	84.4		
		Dikamba		2.5	82.1	84.4	88.9	88.6			
				3.0	81.6	83.9	87.1	89.2			
				4.0	87.1	85.3	90.0	92.0			
Pikloram		2.5		44.5	45.8	45.4	51.6				
		3.0		48.1	43.6	72.7	55.8				
		4.0		56.7	46.2	53.1	56.7				
Phytigel		2,4-D		2.5	83.8	84.4	83.8	88.6			
				3.0	87.4	84.9	92.1	91.7			
				4.0	85.8	80.8	88.6	81.8			
		Dikamba	2.5	86.8	81.8	86.5	91.7				
			3.0	89.9	82.4	92.4	92.1				
			4.0	87.5	85.8	92.5	94.9				
		Pikloram	2.5	51.4	47.2	48.1	47.8				
			3.0	48.1	43.9	53.1	54.8				
			4.0	48.3	47.8	51.5	58.3				

Not: VK = %8.4; Genotip LSD_(0.05) = 2.1; Oksin tipi LSD_(0.05) = 1.8; Oksin dozu LSD_(0.05) = 1.8



Şekil 1. Olgun embriyo kültüründe kallus, embriyogenik kallus, embriyogenik olmayan kallus ve yeşil noktalardan sürgün oluşumu. (a) Kırık genotipinde 4 mg/l dikamba + phytigel içeren kallus ortamında kültürün 10. günündeki kallusların görünümü. (b) Gerek 79 genotipinde 2.5 mg/l dikamba + phytigel ortamında meydana gelen embriyogenik kallus ve üzerinde somatik embriyoların görünümü (c) Haymana 79 genotipinde 2.5 mg/l 2,4-D + agar ortamında meydana gelen embriyogenik olmayan kallusların görünümü (d) Kırık genotipinde 4 mg/l dikamba + phytigel ortamında meydana gelen kalluslarından R1 ortamında meydana gelen sürgünlerin görünümü.

TARTIŞMA

Tahıllardaki genetik mühendisliği çalışmaları etkili bir bitki doku kültürü sistemine bağlıdır. Buğdayda, genetik mühendisliği tekniklerinden yararlanılarak gen aktarmada önemli bir adım olan kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu çalışmalarında başarının büyük ölçüde genotipe bağlı olduğu bilinmektedir (Şehirli ve Özgen 1998). Bu çalışmada kallus oluşumu, embriyogenik kallus, somatik embriyo oluşumu ve rejenerasyon kapasitesi üzerine kullanılan genotipler arasında önemli farkların olduğu saptanmıştır. Bu konuda yapılan birçok çalışmada da benzer bulgular elde edilmiştir (Özgen vd. 1996; Özgen vd. 1998; Rashid vd. 2002; Sarker ve Biswas 2002; Li vd. 2003; Zale vd. 2004; Chen vd. 2006; Patnaik vd. 2006; Ahmet ve Adak 2007 ve Bı vd. 2007). Haliloglu and Baenzinger (2005) tarafından buğdayda yapılan bir çalışmada somatik embriyo oluşumu üzerine genotipik etkinin çok önemli olduğu saptanmıştır. Araştırmacılar eksplant kaynağı olarak olgunlaşmamış embriyoları kullanmışlar, somatik embriyo sayısının 11.5–19.3

adet arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Bu değer çalışmada elde ettiğimiz bulgulardan daha yüksektir. Bunun muhtemel en önemli nedeni kullanılan eksplant kaynağı ve genotiplerin farklı oluşudur. Nitekim birçok araştırmacı, eksplant kaynağı olarak olgunlaşmamış embriyoların olgun embriyolara göre doku kültürüne daha iyi tepki verdiklerini bildirmişlerdir (Redway vd. 1990; Özgen vd. 1996; Özgen vd. 1998; Mendoza ve Kaepler 2002; Patnaik ve Khurana 2003; Zale vd. 2004).

Bu çalışmada jel yapıcı maddenin kallus, embriyogenik kallus, somatik embriyo oluşumlarına ve rejenerasyon kapasitelerine olan etkisi çok önemli olmuş, kallus, embriyogenik kallus ve somatik embriyo oluşumlarında ve de rejenerasyon kapasitesi bakımından en iyi jel yapıcı maddenin phytigel olduğu belirlenmiştir. Nitekim, armut bitkisinin yapraklarından tomurcuk rejenerasyonu üzerine çalışan Chevreau vd. (1997), jel yapıcı madde olarak agar yerine phytigel kullanıldığında, bütün armut genotiplerinde tomurcuk rejenerasyonunun önemli derecede arttığını ve phytagelin hücre bölünmesine

hızlandırdığını, buna bağlı olarak daha fazla kallus oluştuğunu bildirmişlerdir. Yine, Ma ve Pulli (2004) çavdarda embriyo kültüründe phytagelin agardan daha iyi olduğunu kaydetmişlerdir. Diğer taraftan. Çavdarda anter kültüründe (Flehinghaus vd. 1991) ve embriyo kültüründe (Popelka ve Altpeter 2001) embriyogenik kallus oluşumunda gelrite ve agarozun etkileri araştırılmış bunlardan gelrite'nin agarozdan daha etkili olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, *Croton sublyratus* (Morimoto ve Murai 1989), mısır (Tremellat ve 1990). *phalaenopsis* (Ishii vd. 1998) bitkilerinde kallus oluşum oranlarının jel yapıcı maddeye göre değiştiğini saptamışlardır.

Bu çalışmada kullanılan oksin tiplerinden dikamba çalışmada incelenen tüm parametrelerde diğer oksin tiplerinden (2,4-D ve pikloram) daha etkili olduğu belirlenmiştir. Nitekim Papenfuss and Carmen (1987), dikambanın, metabolizma tarafından daha hızlı kullanıldığını ve bu nedenle sürgün oluşumunu artırdığını bildirmişlerdir. Buna karşın 2,4-D, enzimatik parçalanmaya ve birleşmeye direnç göstermekte ve bu nedenle bitki hücrelerinde yüksek oranda kararlı bir şekilde kalabilmektedir (Moore 1989).

Rejenerasyon kapasitesi, bitki rejenerasyonu açısından önemli bir göstergedir. Nitekim, Özgen vd. (1998), kallusların rejenerasyon kapasitesi ile kültür etkinliği arasında olumlu ve çok önemli ($r = 0.835$; $p < 0.01$) bir ilişkinin olduğunu bildirmişlerdir. Rejenerasyon ortamı konusunda yapılan çalışmalarda değişik hormonların farklı dozları ve/veya kombinasyonları kullanılmış, denemelere göre farklı sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin, Jones (2005), kallusların rejenerasyonu için BAP gibi sitokinlerin ve/veya oksinlerin düşük konsantrasyonlarının kullanıldığını bildirmişlerdir. Yine, Rashid vd. (2002), bitki rejenerasyonu için 0.1 mg/l IAA (İndol-3-asetik asit) ve BAP'ın değişik konsantrasyonlarını denemişler ve en yüksek rejenerasyonun 0.1 mg/l IAA + 0.5 mg/l BAP'da meydana geldiğini rapor etmişlerdir. Bir başka çalışmada (Zale vd. 2004) buğday genotiplerinin olgun embriyo kültüründe oksinsiz 0.1 mg/l BAP içeren ortamı kullanmışlardır. Ayrıca Przetakiewicz vd. (2003), buğdayda olgunlaşmamış embriyo kültürü için hormonsuz ortam ile 0.2 mg/l IAA + 1 mg/l BAP içeren ortamı kullanmışlar ve en yüksek rejenerasyonun ikinci ortamda meydana geldiğini belirlemişlerdir.

Bu araştırma sonucunda buğday olgun embriyo kültüründe kallus oluşumu ve rejenerasyon kapasitesi belirleyen en önemli faktörün genotip olduğu, olgun embriyo kültüründe jel yapıcı madde olarak phytagelin agardan ve oksin tipi olarak ise dikambanın 2,4-D ve pikloramdan daha etkili olduğu belirlenmiştir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP 2005/48) yönetim birimine teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Ahmet, H., Adak, M.S., 2007. Irakta yetiştirilen bazı ekmeklik buğday çeşitlerinde kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonu. Tarım Bilimleri Dergisi,13(3): 285-292.
- Babaoğlu, M., Yorgancılar, M., Akbudak, M. A., 2001. Doku kültürü: temel laboratuvar teknikleri. Bitki Biyoteknolojisi I, Özcan, S., Gürel, E., Babaoğlu, M., S.Ü. Basımevi, 1-35s, Konya.
- Bahieldin, A., Dyer, W. E., Qu, R., 2000. Concentration effects of dikamba on shoot regeneration in wheat. Plant Breeding, 119: 437-439.
- Bi, R.M., Kou M., Chen L.G., Mao S.R., Wang H.G., 2007. Plant regeneration through callus initiation from mature embryo of *Triticum*. Plant Breeding,126 (9): 9-12.
- 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.
- Chen J.Y., Yue R.Q., Xu H.X., Chen X.J., 2006. Study on plant regeneration of wheat mature embryo under endosperm-supported culture. Agric. Sci. China,5: 572-578.
- Chevreau, E., Mourgues, F., Neveu, M., Chevalier, M.,1997. Effect of gelling agents and antibiotics on adventitious bud regeneration from in vitro leaves of pear. In Vitro Cellular & Developmental Biology, 33 (3): 173-179.
- Delporte, F., Mostade, O., Jacquemin, J. M., 2001. Plant regeneration through callus initiation from thin mature embryo fragments of wheat. Plant cell, tissue and organ culture, 67: 73-80
- Elena, B. E., Ginzo, H. D., 1988. Effect of auxin levels on shoot formation with different embryo tissues from a cultivar and a commercial hybrid of wheat (*Triticum aestivum* L.). J. Plant Physiol., 132: 600-603.
- Fennel, S., Bohorova, N., Ginkel, M., Crossa, J., Hoisington, D. A., 1996. Plant regeneration from immature embryos of 48 elite CIMMYT bread wheats. Theor Appl Genet., 92: 163-169.
- Filippov, M., Miroshnichenko D., Vernikovskaya D., Dolgov S., 2006. The effect of auxin and exposure to auxin and genotypes on somatic embryogenesis from mature embryos of wheat. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 84: 213-222.
- Flehinghaus, T., Deimling, S., Geiger, H. H., 1991. Methodical improvements in rye anther culture. Plant Cell Reports, 10: 397-400.
- Halilolu, K., Baenzinger, P. S., 2003a. *Agrobacterium tumefaciens* mediated wheat transformation. Cereal Research Communications, 31(1-2): 9-16.
- Halilolu, K., Baenzinger, P. S., 2003b. The effect of age and size of wheat anther culture-driven embryos on regeneration of green and albino plantlets. Israel journal of plant sciences, 51: 207-212.
- Halilolu, K., Baenzinger, P. S., 2005. Screening wheat genotypes for high callus induction and regeneration capability from immature embryos cultures. J. Plant Biochemistry and Biotechnology, 14: 77-82.
- Halilolu, K., 2006. Efficient regeneration system from wheat leaf base segments. Biologia Plantarum, 50 (3): 326-330.
- Hess, J. R., Carman, J. G., 1998. Embryogenic competence of immature wheat embryos: genotype, donor plant environment and endogenous hormone levels. Crop Science, 38: 249-253. <http://www.agron.missouri.edu/mnl/64/index.html>. (25.05.2006).

- Ingram, H. M., Power, J. B., Lowe, K. C., Davey, M. R., 2000. Microspore-derived embryo induction from cultured anthers of wheat. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 60: 235-238.
- Ishii Y., Takamura T., Goi, M., Tanaka, M., 1998. Callus induction and somatic embryogenesis of Phalaenopsis. *Plant Cell Reports*, 17: 446-450
- Li, W., Ding, C. H., Hu, Z., Lu, W., Guo G. Q., 2003. Relationship between tissue culture and agronomic traits of spring wheat. *Plant science*, 164: 1079-1085
- Ma, R., Pulli, S., 2004. Factors influencing somatic embryogenesis and regeneration ability in somatic culture of spring and winter rye. *Agriculture and Food Science*, 13: 363-377.
- Mathias, R. J., Simpson, E. S., 1986. The interaction of genotype and culture medium on the tissue culture responses of wheat (*Triticum aestivum* L. em. thell) callus. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 7: 31-37
- Mc Hugen, A., 1983. Rapid regeneration of wheat in vitro. *Ann Bot.*, 51: 851-853.
- Mendoza, M. G., Kaeppler, H. F., 2002. Auxin and sugar effects on callus induction and plant regeneration frequencies from mature embryos of Wheat (*Triticum aestivum*). *In vitro Cell. Dev. Biol.-plant* 38: 39-45.
- Moore, T.C., 1989. *Biochemistry and physiology of plant hormones*. Springer, New York.
- Morimoto, H., Murai, F., 1989. the effect of gelling agents on plaunotol accumulation in callus cultures of *Croton sublyratus*. *Plant Cell Reports*, 8 (4): 210-213.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 15: 473-497.
- Özgen M., Türet M., Özcan S., Sancak, C., 1996. Callus induction and plant regeneration from immature and mature embryos of winter durum wheat genotypes. *Plant Breed.*, 115: 455-458.
- Özgen, M., Türet, M., Altunok, S., Sancak, C., 1998. Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat genotypes. *Plant Cell reports*, 18: 331-335.
- Ozias-Akins P., Vasil, I. K., 1982. Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of *Triticum aestivum* (wheat): evidence for somatic embryogenesis. *Protoplasma*, 110: 95-105
- Papenfuss, J. M., Carman, J. G., 1987. Enhanced regeneration from wheat callus cultures using dicamba and kinetin. *Crop Science*, 27: 588-593.
- Patnaik, D., Khurana P., 2003. Genetic transformation of indian bread (*Triticum aestivum*) and pasta (*Triticum durum*) wheat by particle bombardment of mature embryo-driven cali. *BMC plant biology*, 3(5): 1-11.
- Patnaik, D., Vishnudason D., Khurana P., 2006. *Agrobacterium*-mediated transformation of mature embryos *Triticum aestivum* and *Triticum durum*. *Current Science*, 91(3): 307-317.
- Popelka, J. C., Altpeter, F., 2001. Interactions between genotypes and culture media components for improved in vitro response of rye inbred lines. *Plant Cell Reports*, 20: 575-582.
- 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.
- 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.
- Redway, F. A., Vasil, V., Lu D., Vasil, I. K., 1990. Identification of callus types for long-term maintenance and regeneration from commercial cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet*, 79: 609-617.
- Sarker, R.H., Biswas A., 2002. *In vitro* plantlet regeneration and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Tissue Cult.*, 12 (2): 155-165.
- 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: 1830-1846.
- Şehirali, S., Özgen M., 1998. Bitki Islahı, Ankara Üniv. Ziraat Fakültesi yayınları:1059; Ders kitabı:310. Ankara Üniv. Basımevi, Ankara, s261.
- Shah, M., I., Jabeen, M., ILahi, I., 2003. In vitro callus induction ,its proliferation and regeneration in seed explants of wheat (*Triticum aestivum*) . *Pak.j. Bot.*, 35(2): 209-217
- Simonson, R. L., Baenzinger, P. S., 1992. The effect of gelling agents on wheat anther and immature embryo culture. *Plant Breeding*, 109: 211-217.
- Tremellat, V., Vain P. and Flament, P., 1990. Effect of gelling agent on callus initiation from immature embryos of inbred A188.
- Viertel, K., Hess, D., 1996. Shoot tips as an alternative source for regenerable embryogenic callus cultures. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 44: 183-188;
- Yurkova, G. N., Levenko, B. A., Novozhilov, O. V., 1982. Plant regeneration in wheat tissue culture. *Biochem Physiol*, 177: 337-344.
- Zale, M. J., Borchardt-Wier, H., Kidwell, K. K., Steber C.M., 2004. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of a diverse set of wheat genotypes. *Plant cell, Tissue organ culture*, 76: 227-281.