



Çavdarda (*Secale cereale* L.) Anter Kültüründe Kallus Oluşumu ve Bitkicik Rejenerasyonu Üzerine Genotip, Soğuk Uygulama ve Besin Ortamlarının Etkisi

Nüket Altındal^{1*}, İlknur Akgün²

¹Uşak Üniversitesi, Sivaslı Meslek Yüksekokulu, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Programı, Uşak/Türkiye (ORCID: 0000-0002-9567-1653)

²Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Tarım Bilimleri ve Teknolojileri Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Isparta/Türkiye (ORCID: 0000-0002-7476-72269)

(İlk Geliş Tarihi 24 Haziran 2019 ve Kabul Tarihi 8 Temmuz 2019)

(DOI: 10.31590/ejosat.581763)

ATIF/REFERENCE: Altındal, N. & Akgün, İ. (2019). Çavdarda (*Secale cereale* L.) Anter Kültüründe Kallus Oluşumu ve Bitkicik Rejenerasyonu Üzerine Genotip, Soğuk Uygulama ve Besin Ortamlarının Etkisi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (16), 559-566.

Öz

Bu çalışmada, çavdarda genotipin(diploid ve tetraploid), ön işlem (+4 °C'de 1 hafta süre ön işlem uygulanmış ve uygulanmamış) ve besin ortamlarının (MS, N₆ ve NN) anter kültüründe anter tepki oranı, kallus oluşumu ve yeşil bitkicik rejenerasyonu üzerine etkileri incelenmiştir. Denemede kallus oluşum ortamı olarak MS ortamında 10 g/L agar, NN ortamında 8 g/L agar kullanılmış, ayrıca her iki ortama 2,4 µmol/L Kinetin, 4,4 µmol/L BAP, 2,7 µmol/L NAA ve karbon kaynağı olarak 30,3 g/L sükröz ilave edilmiştir. N₆ ortamına ise 5 g/L agar, 2 mg/L 2,4-D, 0,5 mg/L Kinetin, 1 mg/L IAA ve 90 g/L sükröz ilave edilmiştir. Rejenerasyon ortamı olarak, kallus oluşum ortamı olan MS ve NN ortamları aynı kalmış ancak modifiye edilmiş N₆ ortamına 2 g/L aktif karbon, karbon kaynağı olarak 20 g/L sükröz, hormon olarak 2 mg/L kinetin, katılaştırıcı madde olarak da 5 g/L agar eklenmiştir. Araştırmada soğuk ön işlem uygulamasının anter tepki oranı ve kallus büyüklüğü üzerine olumsuz, kallus oranı ve kök oluşumu üzerine olumlu etkisi belirlenmiştir. Diğer taraftan soğuk ön uygulamasının incelenen özellikler üzerine etkisi çavdar genotiplerinde farklılık göstermiş ve özelliklerden anter tepki oranı hariç önemli bulunmuştur. Besin ortamlarının kallus oranı ve büyüklüğü üzerine etkisi önemli olurken, anter tepki oranı üzerine etkisi önemsiz olmuştur. En fazla kök oluşumu ve bitki rejenerasyonu soğuk uygulamalı diploid çavdar anterlerinin MS ortamında kültüre alınması ile elde edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Anter kültürü, *in vitro*, kallus, çavdar.

Kısaltmalar

(2,4-D): 2,4 dikloro fenoksi asetik asit

(IAA): Indol-3 asetik asit

(BAP): Benzil amino pürin

(KIN): Kinetin

(MS): Murashige ve Skoog besi ortamı

(NAA): Naftalin asetik asit

(NN): Nitsch ve Nitsch besi ortamı

(N₆): N₆ besi ortamı

(µmol): Mikromol

¹ Sorumlu Yazar: Uşak Üniversitesi, Sivaslı Meslek Yüksekokulu, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Programı, Uşak/Türkiye, ORCID: 0000-0002-9567-1653, nuketaltindal@gmail.com

The Influence of Genotype, Pre-Chilling and Nutrient Media on Callus Induction and Plantlet Regeneration in Rye (*Secale cereale* L.) Anther Culture

Abstract

The present study investigated the effects of genotypes (diploid and tetraploid), of pre-treatment (cold treatment within one week at 4°C and non-cold treatment) and nutrient media (MS, N₆ and NN) on anther response ratio, callus induction and green plantlet regeneration in anther culture of rye. In our experiment, the MS medium (consisting of 10 g/L of agar), NN medium (consisting of 8 g/L agar) and N₆ medium (consisting of 5 g/L of agar) were used for callus formation, MS and NN media supplemented with 2.4 µmol/L of KIN, 4.4 µmol/L of BAP and 2.7 µmol/L of NAA as hormone and 30.3 g/L of sucrose as carbon source. Additionally, N₆ medium supplemented with 2 mg/L 2,4-D, 0.5 mg/L KIN, 1 mg/L IAA as hormone and 90 g/L sucrose as carbon source. Two media (MS and NN) used for callus formation were the same for plantlet regeneration, however N₆ media was modified and included 2 mg/L KIN, 2 g/L activated charcoal, 20 g/L sucrose and 5 g/L agar. Our study demonstrated the negative effect of pre-chilling on anther response ratio and callus size, but it also showed that the positive effect on callus ratio and root formation. On the other hand, effect of pre-chilling on investigated characters changed according to rye genotypes and was significant (except for anther response ratio). While effect of nutrient media on callus ratio and size was significant, it was not significant on anther response ratio. The highest root and plantlet regeneration ratio were obtained as a result of cultured on MS media of pre-chilled anthers in diploid rye.

Keywords: Anther culture, *in vitro*, callus, rye.

Abbreviations

(2,4-D): 2,4-dichlorophenoxyacetic acid
(IAA): Indole-3 acetic acid
(BAP): Benzyl amino purine
(KIN): Kinetin
(MS): Murashige and Skoog nutrient medium
(NAA): Naphthalene acetic acid
(NN): Nitsch and Nitsch nutrient medium
(N₆): N₆ nutrient medium
(µmol): Micromol

1. Giriş

Anter kültürü, haploid veya double haploid bitkileri elde etmek için kullanılan metotlardan birisidir (Mishra ve Goswami, 2014; Plamenov, Belehev, Daskalova, Spetsov, ve Moraliyski, 2013; Qi, Ye, ve Bao, 2011). Anter kültürü ile double haploidlerin hızlı üretimi bitki ıslahında genetik ilerleme için önemli ve ümit verici bir yöntemdir (Islam ve Tuteja, 2012). Double haploid (DH) bitkilerin kullanılmasıyla genetik ve ıslah çalışmaları hızlanmakta, kolaylaşmakta (Başer, Korkut, Bilgin, ve Balkan, 2016) ve yapılan çalışmalarda kısa zamanda seleksiyon etkinliğini artırmak ve homozigotluğu sağlamak için arpa (Çelikaş ve Hatipoğlu, 1997), triticale (Eudes ve Amundsen, 2005; González ve Jouve, 2000), buğday (De Buyser, Henry, Lonnet, Hertzog, ve Hespel, 1987) ve çavdar (Khanna ve Raina, 1998; Ma, Guo, ve Pulli, 2004; Ponitka ve Ślusarkiewicz-Jarzina, 2004; Trejo-Tapia vd., 2002) gibi kendine ve yabancı tozlaşan tahılların ıslah programlarında kullanılmıştır. *In vitro* double haploid üretimi büyük oranda genotipe bağlıdır (Begheyn, Lübberstedt, ve Studer, 2016). Çavdar doku kültürü çalışmalarında (Bazylewska, Broda, Mikołajczyk, ve Pluta, 2015; Targońska, Hromada-Judycka, Bolibok-Bragoszewska, ve Rakoczy-Trojanowska, 2013; Zimny ve Michalski, 2019) özellikle anter veya mikrospor kültürü yoluyla double haploidlerin üretiminde en zorlayıcı türlerden birisi (Mikołajczyk, Broda, ve Weigt, 2012) olup, çavdarda double haploidlerin üretimini arttırmak için farklı çalışmalar yapılmıştır (Immonen, 1999; Immonen ve Anttila, 1999). Çavdarda anter kültüründe yaşanan sorunlar düşük bitki rejenerasyonu ve yüksek albino oranıdır (Ma vd., 2004). Genotip (Jäger, Bartók, Örtög, ve Barnabás, 2010; Oleszczuk, 2013; Tenhola-Roininen, 2009), soğuk ön işlem uygulaması (Plamenov vd., 2013) ve besin ortamının kompozisyonu (Finnie, Powell, ve Dyer, 1989; Saidi, Cherkaoui, Chlyah, ve Chlyah, 1997; Silva, 2010; Trejo-Tapia vd., 2002) gibi bazı faktörlerin androgenik embriyo oluşumu üzerine etkili olduğu bildirilmiştir.

Bu çalışmada diploid ve tetraploid çavdar genotiplerinde uygulanabilir, etkili ve güvenilir anter kültürü yöntemini geliştirmek amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Bitki Materyali

Bu çalışmada, farklı ploidi seviyesine sahip (diploid ve tetraploid) tarla şartlarında yetiştirilen çavdar (*Secale cereale* L.) genotiplerine ait başaklar kullanılmıştır. Her genotipe ait başak örnekleri toplandıktan sonra bayrak yaprak hariç tüm yaprak aksamları uzaklaştırılmış ve plastik bir kapla örtülüp 1 haftalık sürede sapsarıyla birlikte su içinde karanlıkta +4 °C’de bekletilmiştir. Kalan diğer yarısında anterler direk besin ortamına yerleştirilmiştir (Akgün ve Altındal, 2015).

Başaklara %0.5 Tween 80 ve %1.2’lik sodyum hypoklorit içeren solusyonda 20 dakikalık çalkalama ile yüzey sterilizasyonu yapılmıştır. Daha sonra bu başaklar steril suda 5 defa yıkanmıştır. Başağın orta kısmında bulunan anterler steril petri kaplarında başakçıklardan rastgele çıkarılmıştır. Farklı uygulamalar yapılan anterler farklı kültür ortamları içeren her petri kabında (9 cm) 10 adet olacak şekilde kültüre alınmış (Immonen ve Anttila, 1998) ve her uygulama 20 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.

2.2. Anter Kültürü

Denemede kallus oluşum ortamı olarak modifiye edilmiş kültür ortamları kullanılmış ve ortamlarla ilgili bilgiler Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Araştırmada kullanılan kallus oluşum ortamları

Besin ortamı	Hormon	Sükroz (g/L)	Agar (g/L)
MS (Dedicova, Obert, Zofajova, Matusik, ve Pretova, 1999)	2.4 µmol/L KIN	30.3	10
	4.4 µmol/L BAP		
	2.7 µmol/L NAA		
N ₆ (Flehinghaus, Deimling, ve Geiger, 1991)	2 mg/L 2,4-D	90	5
	0.5 mg/L KIN		
	1 mg/L IAA		
NN (Dedicova vd., 1999)	2.4 µmol/L KIN	30.3	8
	4.4 µmol/L BAP		
	2.7 µmol/L NAA		

Rejenerasyon ortamı olarak kullanılan ve Tablo 1’de verilen modifiye edilmiş MS ve NN ortamları aynı kalmış, ancak N₆ ortamı 2 g/L aktif karbon, 20 g/L sükroz, 2 mg/L kinetin ve 5 g/L agar ilave edilerek değiştirilmiştir (Flehinghaus vd., 1991).

Besin ortamlarının pH’ı otoklavdan (15 dakika, 121 °C, 20 psi) önce 5,8’e ayarlanmıştır. Öncelikle tüm uygulamalarda anterler karanlıkta 25 °C’de (Flehinghaus vd., 1991) 4 hafta tutulmuş (Gürel, Tosun, ve Demir, 1993) ve ardından aydınlık ortama (22-25 °C) 14 hafta süreyle konulmuştur. Daha sonra anterlerin kallus oluşturabilme yetenekleri değerlendirilmiş ve oluşan kalluslar rejenerasyon için cam deney tüplerinde (14 cm boy, 2,5 cm çap) 22-25°C’de 4 ay süreyle (Flehinghaus vd., 1991) 16 saat gündüz / 8 saat karanlık fotoperiyodunda (Gürel, 1994) 2000-2200 lüks ışık altında (Gürel vd., 1993) tutulmuştur.

2.3. Gözlemler ve İstatistiksel Analizler

Denemede ele alınan faktörlerin anter tepki oranı, kallus oranı ve büyüklüğü ile yeşil bitkicik rejenerasyonu oranı üzerine etkileri incelenmiştir. Herbir anterin tepki oranı, kallus oluşturabilme yeteneği ve kalluslardan meydana gelen yeşil rejenerantların oranı %’de olarak belirlenmeye çalışılmıştır. Kallus büyüklüğü dijital kumpas yardımı ile ölçülmüştür. Her bir pedri içinde yer alan 10 adet anter uygulama olarak değerlendirilmiş ve 20 tekerrür üzerinden analizler yapılmıştır.

Araştırma, tesadüf parsellerinde faktöriyel deneme desenine göre düzenlenmiş, incelenen özelliklerden anter tepki oranı, kallus oranı ve kallus büyüklüğünden elde edilen veriler SAS programında analiz edilmiştir. Önemli bulunan farklılıkların MSTAT-C programında Duncan çoklu karşılaştırma testi ile kontrolü yapılmıştır.

3. Araştırma Bulguları ve Tartışma

3.1. Anter tepki oranı

Ön işlem olarak soğuk uygulaması anter tepki oranını istatistiksel olarak önemli seviyede azaltmıştır. Soğuk uygulanmayan işlemde anter tepki oranı %74.92 iken, soğuk uygulamasına tabi tutulalarda %71.00 olmuştur. Anter tepki oranı yönünden genotipin etkisi önemli olmamasına rağmen en yüksek anter tepki oranı diploidlerde (%74.83) belirlenmiştir. Denemede kullanılan farklı ortamlara göre anter tepki oranları modifiye edilmiş MS ortamında %76.38, N₆ ortamında %72.25 ve NN ortamında %70.25 olarak belirlenmiştir. Ancak bu farklılıklar istatistiksel olarak önemli olmamıştır.

Farklı ploidi seviyesine sahip anterlerin ön işlem uygulamalarına tepkisiönemli derecede farklılık göstermiştir ($p<0.01$). Nitekim en fazla anter tepki oranı diploidlerde ön üşütme yapılan uygulamalarda (%76.67), tetraploidlerde ise ön üşütme yapılmayanlarda (%76.83) belirlenmiştir (Tablo 2). Farklı ploidi seviyesine sahip genotiplerin farklı besin ortamlarındaki tepkileri benzer olmuş ve genotip x besin ortamı interaksyonu önemsiz bulunmuştur. Ancak ön işleme bağlı olarak farklı besin ortamlarından elde edilen değerler istatistiki olarak farklılıklar göstermiştir ($p<0.01$). En yüksek anter tepki oranı (%80.50) soğuk uygulama yapılmış MS ortamından elde edilmiş, ve ön işlem uygulanan N6 ve NN ortamlarından farklı bulunmuştur ($p<0.01$). Ancak soğuk uygulamaz anterlerde en yüksek anter tepki oranı N6 ortamında belirlenmiş olsa da (%78.00), bu değer ile diğer ortamlar arasındaki fark önemli olmamıştır (Tablo 2). Tüm faktörlerin birlikte interaksyonu anter tepki oranı bakımından önemsiz olmuş, bununla ilgili veriler Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2 Çavdarda ön işlem, genotip ve besin ortamlarının anter tepki oranı üzerine etkisi.

Genotip		Besin ortamı			
Ön işlem		MS	N6	NN	Ortalama
Diploid	Soğuk uygulamalı	85.00	75.00	70.00	76.67a
	Soğuk uygulamaz	70.00	80.00	69.00	73.00ab
	Ortalama	77.50	77.50	69.50	74.83
Tetraploid	Soğuk uygulamalı	76.00	58.00	62.00	65.33b
	Soğuk uygulamaz	74.50	76.00	80.00	76.83a
	Ortalama	75.25	67.00	71.00	71.08
ORTALAMA		76.38	72.25	70.25	
Ön işlem		MS	N6	NN	Ortalama
Soğuk uygulamalı		80.50 A	66.50 B	66.00 B	71.00
Soğuk uygulamaz		72.25 AB	78.00 AB	74.50 AB	74.92

İtalik koyu küçük harf: Genotip x Ön işlem Koyu büyük harf: Ön işlem x Besin ortamı

3.2. Kallus oranı (%)

Kallus oranı üzerine genotipin ve ön işlemin etkisi önemsiz iken, farklı besin ortamlarının etkisi önemli olmuştur ($p<0.01$). Kallus oluşturan anter oranı bakımından diploid ve tetraploidlerde birbirine yakın değerler elde edilmiştir (diploidlerde %12.58, tetraploidlerde %12.92). Soğuk ön işlem uygulanan anterlerde kallus oranı %15.67, soğuk uygulanmayanlarda ise %9.83 olarak belirlenmiştir (Tablo 3). Farklı kültür ortamlarında bulunan anterlerin kallus oluşturabilme kapasitesi değişiklik göstermiş, en yüksek kallus oranı NN ortamında (%18.00) belirlenmiş ve diğer uygulamalar (N6 %11.38; MS %8.88) arasındaki fark önemli olmuştur (Tablo 3). Araştırmada kallus oranı üzerine ön işlem x besin ortamı interaksyonu önemli bulunmuş ve ön işlem olarak soğuk uygulanan anterlerin NN ortamında kallus oluşturabilme yetenekleri daha fazla olmuş (%23.50), en düşük ise ön üşütme yapılmayan MS ve N6 ortamlarında olmuştur (%8.50). (Tablo 3). Üç farklı faktörün birlikte kallus oranı üzerine etkisi önemsiz olmuş ve elde edilen değerler Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3. Çavdarda ön işlem, genotip ve besin ortamlarının kallus oranı üzerine etkisi.

Genotip		Besin ortamı			
Ön işlem		MS	N6	NN	Ortalama
Diploid	Soğuk uygulamalı	10.50	14.50	20.00	15.00
	Soğuk uygulamaz	9.50	7.00	14.00	10.17
	Ortalama	10.00	10.75	17.00	12.58
Tetraploid	Soğuk uygulamalı	8.00	14.00	27.00	16.33
	Soğuk uygulamaz	7.50	10.00	11.00	9.50
	Ortalama	7.75	12.00	19.00	12.92
ORTALAMA		8.88b	11.38b	18.00a	
Ön işlem		MS	N6	NN	Ortalama
Soğuk uygulamalı		9.25 C	14.25B	23.50A	15.67
Soğuk uygulamaz		8.50C	8.50C	12.50 BC	9.83

Koyu küçük harf: Besin ortamı Koyu büyük harf: Ön işlem x Besin ortamı

3.3. Kallus büyüklüğü (mm)

Denemede ele alınan faktörlerden besin ortamı kallus büyüklüğünü önemli seviyede değiştirmiştir ($p<0.05$). Ön işlem uygulaması ve genotipin kallus büyüklüğü üzerine etkisi ise önemsiz bulunmuştur. Genotiplere göre kallus büyüklüğü diploidlerde 2.92 mm;

tetraploidlerde ise 3.05 mm olarak belirlenmiştir. Ön işlem uygulaması durumunda kallus büyüklüğü 2.87 mm; uygulanmayanlarda ise 3.11 mm olmuştur. Kallus büyüklüğü N6 (3.14 mm) ve NN (3.09 mm) besin ortamlarında aynı grupta yer alırken, MS ortamında (2.74 mm) farklılık göstermiştir (Tablo 4). Kallus büyüklüğü ön işlem uygulamasına göre farklı ploidi seviyesine sahip genotiplerde değişkenlik göstermiş, diploidlerde soğuk uygulaması kallus büyüklüğünü olumlu yönde etkilemiş (soğuk uygulananlarda 3.32 mm; uygulanmayanlarda 2.54 mm), tetraploidlerde ise soğuk uygulaması kallus büyüklüğünü önemli seviyede azaltmıştır (soğuk uygulananlarda 2.43 mm; uygulanmayanlarda 3.68 mm) (Tablo 4). Farklı besin ortamlarında diploid ve tetraploid genotiplerin anterlerinden meydana gelen kallusların büyüklüğü farklılık göstermiş ve genotip x besin ortamı etkileşimi önemli bulunmuştur ($p<0.01$). Tetraploidlerde N6 ve NN besin ortamında (sırasıyla 3.22 mm ve 3.42 mm) kallus büyüklüğü MS ortamına (2.52 mm) göre önemli derecede farklı bulunmuştur. Diploidlerde ise kültür ortamlarının etkisi benzer olmuştur (Tablo 4). Araştırma sonuçları besin ortamı ve ön işlem uygulaması olarak değerlendirildiğinde; besin ortamı x ön işlem etkileşimi önemli bulunmuştur ($p<0.01$). Soğuk uygulandığında N6 ve NN besin ortamları rakamsal olarak daha iyi sonuç vermiş (sırasıyla 3.43 mm; 3.20 mm), ancak ön uygulama yapılmadığında da elde edilen sonuçlara benzer olmuştur (Tablo 4). Denemede ele alınan tüm faktörlerin etkileşimi istatistiksel olarak önemli derecede farklılık göstermiştir ($p<0.01$) (Tablo 4).

Tablo 4. Çavdarda ön işlem, genotip ve besin ortamlarının kallus büyüklüğü üzerine etkisi.

Genotip	Ön işlem	Besin ortamı			Ortalama
		MS	N6	NN	
Diploid	Soğuk uygulamalı	2.42 cd	4.05 a	3.49 ab	3.32 a
	Soğuk uygulamasız	3.51 ab	2.08 cd	2.02 cd	2.54 b
	Ortalama	2.96 ABC	3.07 ABC	2.75 BC	2.92
Tetraploid	Soğuk uygulamalı	1.56 d	2.82 bc	2.90 bc	2.43 b
	Soğuk uygulamasız	3.47 ab	3.63 ab	3.95 a	3.68 a
	Ortalama	2.52 C	3.22 AB	3.42 A	3.05
ORTALAMA		2.74 b	3.14 a	3.09 a	
	Ön işlem	MS	N6	NN	Ortalama
	Soğuk uygulamalı	1.99 B	3.43 A	3.20 A	2.87
	Soğuk uygulamasız	3.49 A	2.85 A	2.98 A	3.11

İtalik koyu küçük harf: Genotip x Ön işlem Koyu küçük harf: Besin ortamı Büyük harf: Genotip x Besin ortamı
Küçük harf: Genotip x Ön işlem x Besin ortamı Koyu büyük harf: Ön işlem x Besin ortamı

3.4. Kök oluşumu ve bitkicik rejenerasyonu

Ölçüm yapılan kalluslar 3 farklı besin ortamı içeren cam tüplere aktarılmış ve her tüp içerisine 1 adet kallus konulmuştur. Başlangıçta ön uygulama yapılmamış diploid genotiplerde kalluslardan kök oluşumu sadece N6 ortamında belirlenmiş (%13.79), diğer ortamlarda (MS ve NN) kök gelişimi gözlenmemiştir. Tetraploidlerde ise kök oluşumu NN besin ortamında ortaya çıkmış (%1.85), ancak diğer MS ve N6 ortamlarında kök gelişimi meydana gelmemiştir. Soğuk ön işlem uygulanmış diploid çavdar anterlerinden oluşan kalluslar tüm besin ortamlarında kök oluşumu meydana getirmiş ve kök oluşumu en yüksek MS ortamında (%57.89) gözlenirken, bunu N6 (%7.14) ve NN (%3.57) ortamları takip etmiştir. Tetraploid genotiplerde ise N6 ortamı hariç diğer iki ortamda (MS ve NN) kök oluşumu meydana gelmiştir (MS %6.67; NN %4.55).

Yeşil bitkicik oluşumu yönünden elde edilen başarı kök oluşumu kadar yüksek olmamış, bitkicik oluşumu yalnızca soğuk uygulama yapılan diploid çavdar anterlerinin MS besin ortamında kültüre alınması ile belirlenmiştir (%5.26) (Tablo 5).

Tablo 5. Çavdarda ön işlem, genotip ve besin ortamlarının kök ve bitkicik oluşumu üzerine etkisi.

Ön işlem	Genotip	Besin ortamı	Kök oluşumu (%)	Yeşil bitkicik oluşumu (%)
Soğuk uygulamasız	Diploid	MS	-	-
		N6	13,79	-
		NN	-	-
	Tetraploid	MS	-	-
		N6	-	-
		NN	1,85	-
Soğuk uygulamalı	Diploid	MS	57,89	5,26
		N6	7,14	-
		NN	3,57	-
	Tetraploid	MS	6,67	-
		N6	-	-
		NN	4,55	-

Bu araştırmada anter kültüründe farklı ön işlem ve besin ortamlarının diploid ve tetraploid çavdar genotiplerinde kallus ve bitkicik oluşumu üzerine etkisi belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaca yönelik olarak tarla şartlarında yetiştirilen diploid ve tetraploid genotiplere ait anterler ön işleme (1 hafta soğuk uygulama) tabi tutulmuş modifiye edilmiş 3 farklı besin ortamında kültüre alınmıştır. Çavdarda anter kültürü çalışmalarında en büyük sorun rejenerasyon kapasitesinin çok düşük olmasıdır. Bu sorunu gidermeye yönelik olarak değişik araştırmacılar tarafından farklı yöntemler denenmiştir (Daniel, 1993; Flehinghaus vd., 1991; Ma vd., 2004).

Soğuk ön işlem uygulamasına diploid ve tetraploid çavdarlar farklı tepki göstermiş, diploidlerde soğuk uygulama anter tepki oranını ve kallus sayısını artırmış ancak tetraploidlerde anter tepki oranının düşmesine neden olmuştur. Bu durum soğuk uygulama süresinin genotiplere göre değişebileceğini göstermektedir. Akgün ve Altındal (2015) tarafından çavdarda yapılan bir çalışmada 1 haftalık soğuk ön uygulamasının diploidlerde anter tepki oranını artırdığı bildirilmiştir. Çavdar anter kültüründe başaklara 1 haftalık soğuk uygulama yaygın olarak kullanılmıştır (Daniel, 1993; Flehinghaus vd., 1991; Rakoczy-Trojanowska, Śmiech, ve Malepszy, 1997). Soğuk uygulama ile kültür çavdarında (*Secale cereale* L.) anterlerin sadece yaklaşık %1-3'ünde yüksek rejenerasyon oranı görülmüştür (Daniel, 1993; Flehinghaus-Roux, Deimling, ve Geiger, 1995). Çavdar anter kültüründe başlangıçta genellikle hücre bölünmesi ve kallus oluşumu gözlenmektedir (Zimny ve Michalski, 2019). Yapılan bir çok çalışmada soğuk uygulamanın rejenerasyon oranı ve kallus sayısını artırdığı ve uygun sürenin genotipe göre değiştiği ortaya konulmuştur (Daniel, 1993; Flehinghaus vd., 1991; Immonen ve Anttila, 1996; Szarejko ve Kasha, 1991). Ma vd. (2004) 4 °C'de 1-4 hafta arası soğuk uygulamaya tabi tutulan anterlerden en yüksek kallus oluşumunun meydana geldiğini ifade etmiştir.

Araştırmamızda tetraploidlerde kallus sayısı daha yüksek bulunmuş, ancak anter tepki oranında düşüş görülmüştür. Yapılan bir çalışmada, tüm genotipler için tek bir besin ortamı belirlenememiş ve genotiplere göre kallus oluşumu değişkenlik göstermiş (Rakoczy-Trejanowska vd., 1997) ve yine bir diğer çalışmada kullanılan besin ortamı bitki ıslahında anter kültürünün kullanımını sınırlayan faktörlerden birisi olmuştur (Afza vd., 2000). Buğdayda yapılan anter kültürü çalışmasında genotipin etkisi kallus oluşumu ve yeşil bitki oluşumu üzerine önemli olmuş ve değişkenlik göstermiştir (Weigt, Kiel, Nawracała, ve Pluta, 2015; Weigt, vd., 2016).

Faktör olarak kullanılan soğuk uygulama başlangıçta anter tepkisini azaltsa da, kallus oluşturan anter oranını önemli seviyede artırmasına rağmen kallus büyüklüğünü azaltıcı bir etki yapmıştır. Bu durumun kallus oluşturan anter sayısının daha fazla olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Yapılan araştırmalarda anterlerin yerleştirme yoğunluğunun kallus oluşumu üzerine etkili olduğu ortaya konulmuştur (Ma vd., 2004)

Ana ortamın içeriği androgenesiste başarı için önemli faktörlerden biridir. Şimdiye kadar tek besin ortamı çalışmalarda kullanılmamış, genotip ve kültür şartlarına göre birçok ortamlar denenmiştir. Diğer bitkilerde olduğu gibi çavdar anter kültüründe de çeşitli besin ortamları kullanılmıştır (Daniel, 1993; Immonen ve Anttila, 1996; Guo ve Pulli, 2000; Wenzel, Hoffmann, Thomas, 1977). Çalışmamızda yeşil bitkicik oluşumunda N6 ve NN ortamlarının MS ortamına göre yetersiz olduğu görülmüştür. Elde edilen bu sonucun çavdarda (Immonen ve Anttila, 1999), arpada (Dedicova vd., 1999) ve çeltikte (Mandal ve Bandyopadhyay 1997) yapılan çalışmalar ile paralellik gösterdiği açık vearaştırmacılar çalışmalarında N6 ortamının da rejenerasyon için yetersiz olduğunu ortaya koymuşlardır. Ancak genel olarak kallus sayısı ve kallus büyüklüğü bakımından N6 ortamının daha iyi sonuç verdiği çalışmamızda ortaya çıkmış ve Immonen (1999) tarafından yapılan çalışmayla uyumluluk göstermiştir.

Soğuk ön uygulamasının incelenen özellikler üzerine etkisi incelendiğinde; diploid ve tetraploid çavdar varyetelerinde farklılık göstermiştir. Nitekim soğuk ön işlem uygulaması diploid varyetelerde kallus büyüklüğünü ve kalluslardan kök gelişimini önemli seviyede teşvik etmiş, kök oluşumu incelenen tüm besin ortamlarında %3.57-57.89 arasında değişkenlik göstermiştir. Çalışmamızda çavdarda yeşil bitkicik oluşumu yetersiz kalmıştır. Soğuk uygulamalı diploid çavdarlarda yeşil bitkicik oluşumu düşük oranda gözlenirken, tetraploidlerde ise gözlenememiştir. Bu duruma tetraploidlerde daha fazla heterozigotluğun bulunması yanında ortam faktörleri de etkili olmuş olabilir. Nitekim haploid bitki elde etmede bitki genotipinin önemli olduğu değişik araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Hatipoğlu ve Sakin, 1996). Powell (1998) çalışmasında arpa genotiplerinin soğuk ön uygulamasına tepkilerinin farklı olduğunu ifade etmiştir. Ayrıca diğer tahıllar içerisinde çavdarın uygulanan işlemlere karşı zor tepki veren bir tür olduğu kallus oluşumu, bitki rejenerasyonu ve yüksek albino bitki oranının büyük sorun olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur (Guo ve Pulli, 2000; Ma vd., 2004).

Soğuk ön uygulama yapılmamış diploid genotiplerde kalluslardan kök oluşumu (%0.0-13.79) tetraploid genotipten (%0.0-1.85) daha fazla olmuş, ancak yeşil bitkicik oluşumu her iki genotipte de meydana gelmemiştir. Bu sonuçlar yine ön işlem olarak soğuk uygulama süresinin genotiplere göre değişebileceğini göstermektedir. Yapılan bir çalışmada çavdarda 4 °C'de başaklara 1 hafta soğuk uygulama mikrospor kültüründe başarı şansını artırmıştır (Mikołajczyk vd., 2012).

Besin ortamlarının kalluslardan kök oluşumu ve yeşil bitkicik oluşumu üzerine etkisi dikkate alındığında, soğuk ön işlem uygulanan tetraploid genotipte modifiye edilmiş N6 ortamı hariç denemeye alınan diğer tüm ortamlarda kök oluşumu olumlu yönde teşvik edilmiş, en fazla kök oluşumu (%57.89) modifiye edilmiş MS ortamında belirlenmiştir. Yine yeşil bitkicik gelişimi soğuk uygulamalı ve MS ortamı kullanılan denemeden elde edilmiştir. Ön işlem uygulanmayan diploid genotipte kök oluşumunun modifiye edilmiş N6 ortamında (%13.79) tetraploidlerde ise modifiye edilmiş NN ortamında (%1.85) ortaya çıkmış,, ancak yeşil bitkicik oluşumu hiçbir ortamda meydana gelmemiştir.

Anter kültüründe başarıyı etkileyen faktörler arasında anterlerin alındığı donör bitkinin yetiştirme koşulları (Dodds ve Roberts, 1985; Mikołajczyk vd., 2012), kültürdeki anter yoğunluğu (Cho ve Zapata, 1990), çevre şartları (Mikołajczyk, 2012), besi ortamı ve başaklara soğuk uygulama (Tenhola-Roininen, Tanhuanpää, ve Immonen, 2005; Mikołajczyk vd., 2012) ve genotip (Oleszczuk, 2013) sayılabilmektedir. Çalışmamızda da genotip, besi ortamları kompozisyonu ve soğuk uygulama sonuçlarımızı etkilemiş ve değişkenlik göstermiştir.

4. Sonuç

Sonuç olarak, çalışmamızda çavdarda anter kültüründe kallus oluşumu ve yeşil bitkicik rejenerasyonu diğer tahıllara göre çok zor olup, genotiplere göre soğuk uygulama süresi ve besin ortamlarının değişiklik gösterebileceği ortaya konulmuştur. Çavdarda anter kültüründe uygun metotların oturturabilmesi için çalışmaların yoğunlaşması gerektiği sonucuna varılmıştır.

5. Kaynaklar

- Afza, R., Shen, M., Zapata-Arias, F. J., Xie, J., Fundi, H. K., Lee, K. S., Bobadilla-Mucino, E. ve Kodym, A. (2000). Effect of spikelet position on rice anther culture efficiency. *Plant Science*, 153(2), 155-159.
- Akgün, İ. ve Altındal, N. (2015). Effects of carbohydrate sources, pre-chilling application and ploidy levels on anther culture in rye (*Secale cereale* L.). *Academia Journal of Biotechnology*, 3(6), 111-116.
- Başer, İ., Korkut, K. Z., Bilgin, O. ve Balkan, A. (2016). Anther kültürü tekniği ile ekmeçlik buğday (*Triticum aestivum* L.) melez populasyonlarından doubled haploid bitkilerin elde edilmesi. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 25(Özel sayı-1), 232-236.
- Bazylewska, J., Broda, Z., Mikołajczyk, S. ve Pluta, M. (2015). Induction of haploids in the genus *Secale* L. via androgenesis. Session I: Plant differentiation processes in the culture of somatic cells and cells of generative pathwa, *BioTechnologia*, 96(1), 55.
- Begheyn, R. F., Lübberstedt, T. ve Studer, B. (2016). Haploid and doubled haploid techniques in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) to advance research and breeding. *Agronomy*, 6, 60.
- Cho, M. S. ve Zapata, F. J.(1990). Plant regeneration from isolated microspores of indica rice. *Plant and Cell Physiology*, 31, 881-885.
- Çeliktaş, N. ve Hatipoğlu, R.(1997). Arpa (*Hordeum vulgare* L.) anther kültüründe genotip, soğuk uygulama süresi ve besi ortamı 2,4-D içeriğinin etkisi. *Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 12(2),63-172.
- Daniel, G.(1993). Anther culture in rye: improved plant regeneration using modified MS-media. *Plant Breeding*, 110, 259-261.
- De Buysse, J., Henry, Y., Lonnet, P., Hertzog, R. ve Hespel, A.(1987). *Florin*: a doubled haploid wheat variety developed by anther culture method. *Plant Breeding*, 98, 53-56.
- Dedicova, B., Obert, B., Zofajova, A., Matusik, M. ve Pretova, A.(1999). Anther cultures of barley. *Biologia-Bratislava*, 54(1), 91-99.
- Dodds, J. H. ve Roberts, L. W.(1985). *Experiments in plant tissue culture*. Cambridge University Press, New York.
- Eudes F. ve Amundsen, E.(2005). Isolated microspore culture of Canadian 6 x triticale cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82, 233-241.
- Finnie, S.J., Powell, W. ve Dyer, A. F.(1989). The effect of carbohydrate composition and concentration on anther culture response in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Breeding*, 103, 110-118.
- Flehinghaus, T., Deimling, S. ve Geiger, H. H.(1991). Methodical improvements in rye anther culture. *Plant Cell Reports*, 10, 397-400.
- Flehinghaus-Roux, T., Deimling, S. ve Geiger, H. H.(1995). Anther-culture ability in *Secale cereale* L. *Plant Breeding*, 114, 259-261.
- Guo, Y. D. ve Pulli S.(2000). Isolated microspore culture and plant regeneration in rye (*Secale cereale* L.). *Plant Cell Reports*, 19, 875-880.
- Gürel, A., Tosun, M. ve Demir, İ.(1993). Bazı makarnalık ve ekmeçlik buğday genotiplerinin anther kültürüne reaksiyonları. *Anadolu, J. of AARI*, 2, 98-111.
- Gürel, A.(1994). *Susam (Sesamum indicum L.)'da anther kültürü*. Tarla Bitkileri Kongresi, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi, 25-29 Nisan, Bornova.
- González, J. M. ve Jouve, N. (2000). Improvement of anther culture media for haploid production in triticale. *Cereal Research Communications*, 28, 65-72.
- Hatipoğlu, R. ve Sakin, M. A.(1996). Tütün (*Nicotiana tabacum*) anther kültüründe genotip ve besi ortamının haploid bitki oluşumuna etkileri üzerinde araştırma. *Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 11(4), 107-116.
- Immonen, S. ve Anttila, H.(1996). Success in anther culture of rye. *Vorträge für Pflanzenzüchtung*, 35, 237- 244.
- Immonen, S. ve Anttila, H. (1998). Impact of microspore developmental stage on induction and plant regeneration in rye anther culture. *Plant Science*, 139(2), 213-222.
- Immonen, S.(1999). Androgenetic green plants from winter rye, *Secale cereale* L., of diverse origin. *Plant Breeding*, 118, 319-322.
- Immonen, S. ve Anttila, H.(1999). Cold pretreatment to enhance green plant regeneration from rye anther culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 57, 121-127.
- Islam, S. M. S. ve Tuteja, N. (2012). Enhancement of androgenesis by abiotic stress and other pretreatments in major crop species. *Plant Science*, 182, 134-144.
- Jäger, K., Bartók, T., Ördög, V. ve Barnabás, B.(2010). Improvement of maize (*Zea mays* L.) anther culture responses by algae-derived natural substances. *South African Journal of Botany*, 76(3), 511-516.
- Khanna, H. K. ve Raina, S. K. (1998). Genotype x culture media interaction effects on regeneration response of three indica rice cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 52, 145-153.
- Ma, R., Guo, Y. D. ve Pulli, S. (2004). Comparison of anther and microspore culture in the embryogenesis and regeneration of rye (*Secale cereale* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 76, 147-157.
- Mandal, A. B. ve Bandyopadhyay, A. K. (1997). In vitro anther culture response in indica rice hybrids. *Cereal Research Communications*, 25(4), 891-896.
- Mikołajczyk, S., Broda, Z. ve Weigt, D. (2012). The effect of cold temperature stress on the viability of rye (*Secale cereale* L.) microspores. *BioTechnologia, Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology*, 93(2), 139-142.
- Mishra, V. K. ve Goswami, R. (2014). Haploid production in higher plant. *International Journal of Chemical and Biochemical Science*, Review Paper, 1, 25-45.
- Oleszczuk, S., Zimny, J., Makowska, K., Zimny, A., Czaplicki, A., Kozdój, J. ve Sowa, S. (2013). Using androgenesis in studies on single cell-derived embryo development. *Modern Phytomorphology*, 4, 17-20.
- Plamenov, D., Belchev, I., Daskalova, N., Spetsov, P. ve Moraliyski, T. (2013). Application of a low dose of gamma rays in wheat androgenesis. *Archives of Biological Sciences*, 65(1), 291-296.

- Ponitka, A. ve Ślusarkiewicz-Jarzina, A. (2004). Cleared-ovule technique used for rapid access to early embryo development in *Secale cereale* × *Zea mays* crosses. *Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica*, 46, 133-137.
- Powell, W. (1998). The influence of genotype and temperature pre-treatment on anther culture response in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 12, 291-297.
- Qi, Y., Ye, Y. ve Bao, M. (2011). Establishment of plant regeneration system from anther culture of *Tagetes patula*. *African Journal of Biotechnology*, 10(75), 17332- 17338.
- Rakoczy-Trojanowska, M., Śmiech, M. ve Malepszy, S. (1997). The influence of genotype and medium on rye (*Secale cereale* L.) anther culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 48, 15-21.
- Saidi, N., Cherkaoui, S., Chlyah, A. ve Chlyah, H. (1997). Embryo formation and regeneration in *Triticum turgidum* ssp. durum anther culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 51, 27-33.
- Silva, T. D. (2010). Indica rice anther culture: can the impasse be surpassed?. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 100, 1-11.
- Szarejko, I. ve Kasha, K. J. (1991). Induction of anther culture derived doubled haploids in barley. *Cereal Research Communications*, 19, 219-237.
- Targońska, M., Hromada-Judycka, A., Bolibok-Bragoszewska, H. ve Rakoczy-Trojanowska, M. (2013). The specificity and genetic background of the rye (*Secale cereale* L.) tissue culture response. *Plant Cell Reports*, 32(1), 1-9.
- Tenhola-Roininen, T., Tanhuanpää P. ve Immonen S. 2005. The effect of cold and heat treatments on the anther culture response of diverse rye genotypes. *Euphytica*, 145, 1-9.
- Tenhola-Roininen, T. (2009). Rye Doubled Haploids: production and use in mapping studies. *Jyväskylä Studies in Biological and Environmental Science*, 198, 93.
- Trejo-Tapia, G., Amaya, U. M., Morales, G. S., Sánchez, A. D. J., Bonfil, B. M., Rodríguez-Monroy, M. ve Jiménez-Aparicio, A. (2002). The Effects of cold-pretreatment, auxins and carbon source on anther culture of rice. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 71, 41-46.
- Weigt, D., Kiel, A., Nawracała, J. ve Pluta, M. (2015). The androgenic response in anther culture of spring wheat is greater in genotypes with solid stem in contrast to genotypes with hollow stem. *BioTechnologia*, 96(1), 90.
- Weigt, D., Kiel, A., Nawracała, J., Tomkowiak, A., Kurasiak-Popowska, D., Idzı Siatkowski, I. ve Ługowska, B. (2016). Obtaining doubled haploid lines of the *Lr19* gene using anther cultures of winter wheat genotypes. *BioTechnologia, Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology*, 97(4), 285-293.
- Wenzel, G., Hoffmann, F. ve Thomas, E. (1977). Increased induction and chromosome doubling of androgenetic haploid rye. *Theoretical and Applied Genetics*, 51, 81-86.
- Zimny, J. ve Michalski, K. (2019). Development *in vitro* culture techniques of advancement rye (*Secale cereale* L.) breeding. *Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica*, 61/1, DOI: 10.24425/abcsb.2019.127735.