

Buğdayda F₂ Generasyonunda Anter Kültürü Tekniği Kullanılarak Saf Hatların Elde Edilmesi

*Özcan YORGANCILAR¹ Aysel YORGANCILAR¹ Serhat DİKMEN² Serdar DİKMEN²
Merve ÇARIKÇI¹ Fikret EVCEN² Fahriye VAN² Pervin UZUN¹
Aysen YUMURTACI³ İmren KUTLU⁴ Zeynep SİREL¹

¹Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü Enstitüsü Müdürlüğü, Eskişehir

²Dikmen Tarım Ürünleri Limited Şirketi Söğüt, Bilecik

³Marmara Üniversitesi Biyoloji Bölümü, İstanbul

⁴Osmangazi Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Eskişehir

*Sorumlu yazar e-posta (Corresponding author e-mail): ozcanyorgancilar@yahoo.com

Öz

Bu çalışma 2013-2014 yıllarında Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nde yürütülmüştür. Çalışmanın amacı, klasik buğday ıslah programlarının anter kültürü tekniği ile kombine edilmesi böylece ıslah sürecinin kısaltılması klasik ıslah metodlarına göre daha kısa sürede çok miktarda %100 saf hat elde edilmesi ve dolayısıyla yeni çeşitlerin geliştirilmesinde zaman tasarrufu sağlanarak maliyetin düşürülmesidir. Araştırmada 61 adet ekmeleklik buğday F₂ melezi kullanılmıştır, F₂ melezlerinin tohumlarının vernalizasyon ihtiyacı karşılandıktan sonra 2014 yılı ağustos ayında seraya ekilmiştir. Ekim ayında başaklar alınmaya başlanmıştır, Erken-orta tek çekirdekli dönemde alınan başaklar naylon poşetler ile sarılmış ve 4°C de 12-15 gün süresince bekletilmiştir. Başaklar steril edildikten sonra MN6 besin ortamına her petri kabına 50-100 arasında anter ekimi yapılmıştır. Anterlerin bulunduğu petri kapları 28°C de ve karanlık koşullarda inkubatorlere bırakılmıştır. İnkubatörde 28. günden sonra oluşan kalluslar steril kabin içine alınarak doğrudan 190 II katı rejenerasyon ortamı üzerine aktarılmıştır. Kallusların aktarıldığı petri kapları 25°C de 16 saat ışık (50 µmol s⁻¹ m⁻²) ve 8 saat karanlık koşullarda iklim odalarında bitkiler rejenere oluncaya kadar bekletilmiştir. Bu ortamda gelişen bitkiler 1-1.5 cm olunca 190 II kök besisi ortamını içeren test tüplerine aktarılmıştır. Çalışma sonucunda F₂ bitkilerinden 107,984 anter ekimi yapılmış, 22,979 kallus oluşmuş, 1160 bitki elde edilmiştir. Çalışmanın devamında, elde edilen bitkiler vernalize edilmek üzere 4°C'de soğuk iklim odasına aktarılmaya başlanmıştır. Vernalize edilen bitkiler saksılara aktararak 15°C'de 16 saat ışık/8 saat karanlık ortamda 2 hafta süreyle iklim dolaplarında bekletilecektir. Elde edilen bitkilerin ploidi düzeylerine bakılarak spontan diploid olanlar iklim dolaplarına ve seralara aktarılacaktır. Haploid bitkilere ise colchisin uygulanarak kromozom katlaması yapılacaktır. Tohum elde edilen saf hatlardan daha sonra tohum çoğaltımı yapılacaktır.

Anahtar Kelimeler: Anter, double haploid, buğday

Obtaining the Pure Line in F₂ Generation Wheat Using Anther Culture Technique

Abstract

This study was conducted at the Transitional Zone Agricultural Research Institute in the years 2013-2014. The purpose of the study was providing the combination conventional breeding in tegration with anther culture techniques, so obtaining more than %100 pureline in a short time according to conventional breeding methods, saving time and reducing cost for development of new varieties. In this research, 61 genotypes of F₂ hybrid bread wheat were used. F₂ hybrid seeds were sown in greenhouse in August 2014, after vernalization requirement was satisfied. Grain ears were taken at October, 2014. Ears which were taken at early-midsingle-coreperiod, were wrapped in plastic bags at 4°C and kept during the 12-15 days. After ears were made sterile, anther cultivation was made 50-100 units per each petri dish, in the MN6 nutrient media. Petri dishes which were containing the anthers were left in the incubator at dark conditions and 28°C. Callus which were formed after 28 days in the incubator, was transferred directly into a sterile cabine and inserted in 190 II solid regeneration medium. The petri dishes which callus's were transferred into, were kept at 25°C for 16 hours light (50 µmol s⁻¹ m⁻²) and 8 h dark conditions at the climate chamber until they regenerated. Growing plants in the semedia were transferred to the 190 II medium containing stem test tube when they were done 1-1.5 cm. As a result, 129,744 anther was planted from F₂ hybrids, 14,836 callus were

formed and 1104 plants were obtained. At the continuation of work, the obtained plants began to be transferred into the cold climate chamber at 4°C for the vernalisation. Vernal plants were transferred into pots at 15°C for 16 h light / 8 hours of darkness for waiting two weeks in the climate cabinet. Ploidy level of plants were determined and the spontaneous diploid ones will be transferred to the greenhouse and climate cabinets. Colchicine will be applied to the haploid plants for chromosome doubling. Then, the obtained seeds from the pure lines will be used for the seed multiplication.

Keywords: Anther, double haploid, wheat

Giriş

Buğday ıslahında, üstün genotiplerin geliştirilmesinde katlanmış haploid/dihaploid tekniğinin kullanımı dünyada ve ülkemizde günden güne artmaktadır. Bu teknik, haploid genoma sahip gametlerden geliştirilen bir bitkinin kromozomlarının bazı kimyasallar kullanılarak katlanması sonucunda kromozom sayısının 2 katına çıkarılması ($2n$), böylece %100 homozigot bireylerin elde edilmesini kapsamaktadır (Elliältioğlu 2001). 1973 yılında anter kültürü tekniği ile buğdayda katlanmış haploid bitki üretimi başladıktan sonra haploid bitki üretimi git gide artış göstermiştir. Birçok ülkede başarılı sonuçlar alınmış, bu teknikle Fransa'da Florin adıyla bir çeşit (De Buyser et al. 1987), Çin'de Jinghua No 1 (Hu et al. 1983) ve 764 (Hu et al. 1988), Macaristan'da GK Delibab çeşidi (Pauk et al.1995) geliştirilerek çiftçilerin hizmetine sunulmuştur.

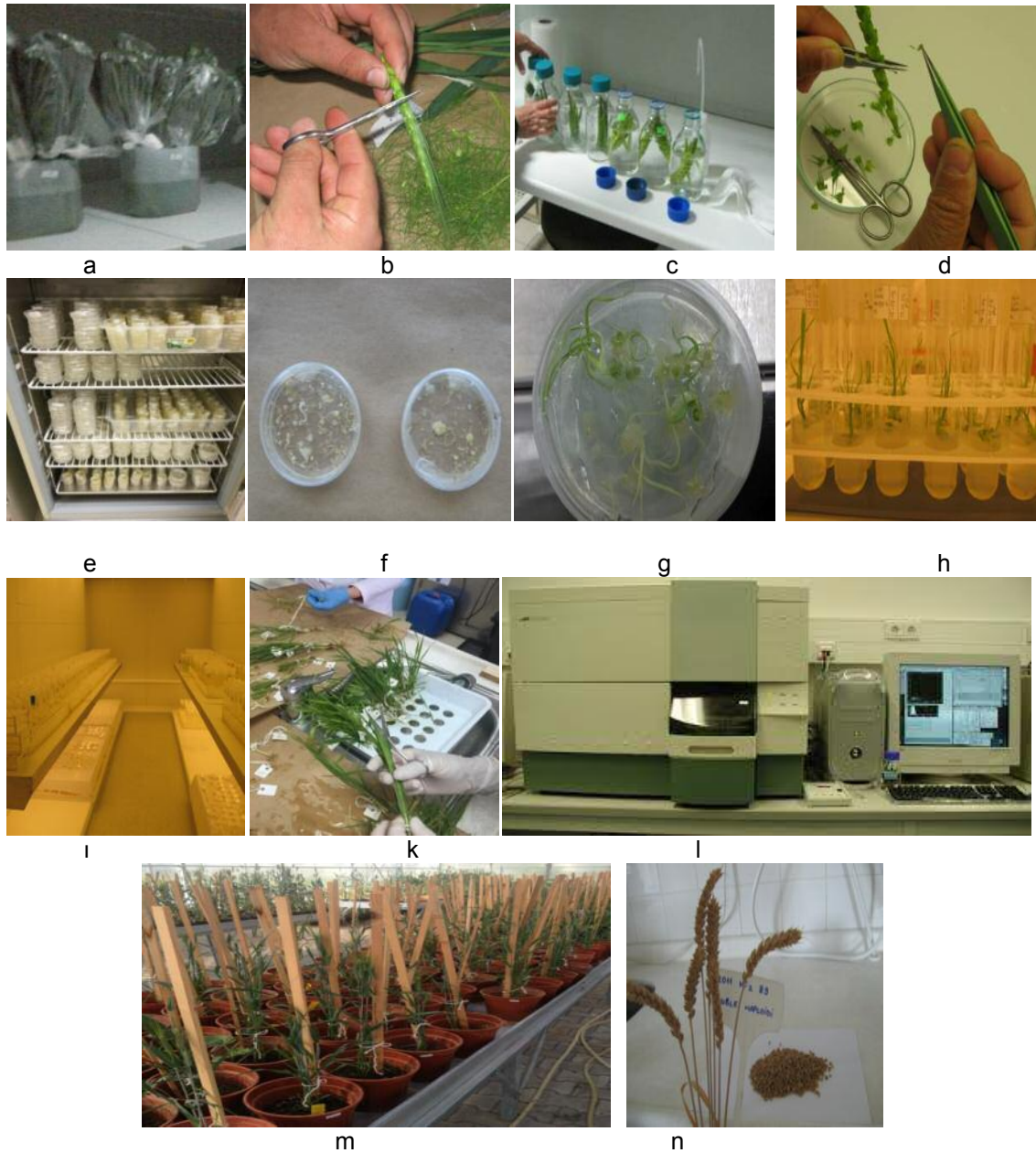
Buğdayda dihaploid üretiminde kullanılan en yaygın iki yöntem, anter kültürü ve buğday ile mısır melezlemesidir (Hussein et al. 2012). Dihaploid bitkilerin elde edilmesinde genel yaklaşım, gametlerin başlangıç materyali olarak kullanıldığı *in vitro* tekniklerdir. Bunlardan anter kültürü tekniği, hem yüksek yanıt alınması ve hem de uygulamasının diğer tekniklere göre daha kolay olması nedeniyle en çok tercih edilen tekniktir. Anter kültürü, olgunlaşmamış polenlerin (mikrosporlar) bulunduğu anterlerin, bitkinin çiçeklerinden izole edilerek doku kültürü koşullarında uygun bir besi ortamında geliştirilmesi ve olgunlaşmamış polenlerden haploid embriyoların elde edilmesi tekniğidir. Tekniğin nihai hedefi kromozom katlanması sağlanarak %100 homozigot saf hatların elde edilmesidir. Kromozom katlanması bazı bitki türlerinde kendiliğinden meydana gelmekle birlikte, genelde kimyasal madde uygulamalarıyla gerçekleştirilmektedir, colchisin gibi antimitotik özellik gösteren kimyasallardan yararlanılmaktadır (Elliältioğlu 2001). Dihaploid bitkilerde karakterleri kontrol eden genler homozigot olmakta ve sonraki generasyonlara olduğu gibi aktarılmaktadır. Çünkü haploid kromozom sayısı iki katına çıkartıldığından aynı

alleller karşı karşıya gelmektedir ve sonuçta genetik kararlılık sağlanmaktadır. Ayrıca, verim ve diğer kantitatif karakterler için erken seleksiyon şansı da mümkün olmaktadır (Snape1989).

Buğdayda F_2 'den başlayan genetik açılımın üst düzeyde bir homozigotluğa ulaşması için en az 6-7 generasyon gerekmektedir. Buna karşın, dihaploid tekniğinde *in vitro* kromozom katlanması sonucu tek generasyonda %100 homozigot saf hatların elde edilmesi mümkündür. Kromozom katlanması ile resesif genlerin sorumlu olduğu karakterler, dominant genler tarafından örtülemeyeceğinden ve eklemeli gen etkisi ikiye katlandığından %100 homozigot olan dihaploid bireylerde, bu karakterleri izlemek çok daha kolaydır. Bir başka deyişle bu bitkilerin döllerinde bir açılım olmadığı için genotipler arasında çok iyi bir ayırım sağlanabilmektedir. Sonuç olarak anter kültürü tekniği ile bir yandan ıslah süresi büyük oranda kısalırken (buğdayda 4-5 yıl) bir yandan da seleksiyonun başarısı dolayısıyla da ıslah etkinliği yüksek oranda artmaktadır.

Materyal ve Yöntem

Çalışmada yurt içi ve yurt dışında geliştirilen tescilli çeşitlerin melezlenmesi sonucu elde edilen 61 adet F_2 melez kombinasyonu materyal olarak kullanılmıştır. Çalışmada kullanılacak buğday başakları, anterlerde bulunan çiçek tozları erken-orta univalent (tek çekirdekli) dönemde (çiçek tozları binoküler altında incelenerek) alınmıştır. Seradan alınan başaklar içinde su bulunan erlenmayere konulmuştur. Alınan başaklar naylon poşetler ile sarılmış ve 4°C' de 12-14 gün süresince bekletilmiştir. Ön soğuk uygulamasından sonra başaklar üzerindeki yaprak ve diğer aksamlar temizlenerek, başaklarda yüzey sterilizasyonu yapılmıştır. Bu amaçla, birkaç damla tween 80 içeren %2'lik sodyum hipoklorit çözeltisi içinde 20 dakika süresince çalkalanmış, steril kabin içinde önceden hazırladığımız steril su ile dört-beş defa yıkanmıştır. Başakçıklardaki anterler steril kabin içinde, steril penslerle alınmış ve daha önceden hazırlanmış, içinde MN6 sıvı besi ortamı bulunan



Şekil 1. a. Ön soğuk uygulaması b,c. Başakların sterilizasyonu d. Anter ekimi e. İnkübatördeki anterlerin görünümü f. Oluşan kalluslar g. Oluşan bitkicikler h. Rejenerasyon ortamındaki bitkicikler i. Bitki büyütme kabindeki bitkiciklerin görünümü k. Colchicine uygulaması l. Flow sitometri m., n.Seradaki bitkiler (çalışmadaki orijinal resimler)

Figure 1. a. Preliminary cold application b,c. Sterilization of spikes d. Anther planting e. Anthers during incubation f. Callus formation g. Plantlets h. Plantlets in regeneration medium i. Plantlets in growth chamber k. Colchicine application l. Flow cytometry m., n. plants in greenhouse (original)

petri (60x10 mm) kaplarına ekilmiştir (Ouyang 1986). Petri kaplarında bulaşmayı önlemek için kapların etrafı parafilm ile sarılarak 29°C'de karanlık inkübatöre konulmuştur. 4-5 hafta sonra oluşan kalluslar bitki rejenerasyonu için 190-II (Zhuang ve Hu 1983) besi ortamına aktarılmıştır. Kallusların aktarıldığı petri kapları 25°C de 16 saat ışık (50 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$) ve 8 saat karanlık iklim odalarında bitkiler rejenerasyon oluncaya kadar bekletilmiştir. Bu ortamda gelişen bitkiler 1-1.5

cm olunca 190 II kök besi ortamını içeren kök tüplerine aktarılmıştır. Kök gelişme ortamına aktarılan bitkicikler 25°C de 16 saat ışık (50 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$) ve 8 saat karanlık iklim odalarında bitkiler gelişinceye kadar (2-3 hafta) bekletilmiştir. Gelişen bitkicikler vernalizasyon isteklerini karşılamak için + 4 °C de 6 hafta süreyle soğuk iklim odasında bekletilmiştir. Besi ortamında yeterince kök ve sürgün gelişmesi gösteren bitkiler saksılara aktarılmıştır.

Çizelge 1. Ekmeklik buğday melezlerinden elde edilen anter, kallus, albino bitkicik, yeşil bitkicik, haploid ve spontan bitki oranları ve sayıları

Table 1. Anter, callus, albino plant, green vegetative, haploid and spontaneous plant ratios and numbers obtained from bread wheat hybrids

Melez No	Melezlerin Pedigrisi	Anter Sayısı (Adet)	Kallus		Albino		Rejenerasyon		Yeşil Bitkicik		Haploid bitki Adet	Spontan bitki Adet
			Adet	%	Adet	%	Adet	%	Adet	%		
1	Porsuk /Sultan	3924	588	14.9	79	13.4	9	1.5	8	1.3	2	6
2	AK 702/Paledor	4922	1876	38.1	223	11.8	44	2.3	42	2.2	10	32
3	AK 702/Garcia	3233	451	13.9	42	9.3	13	2.8	12	2.6	1	11
4	AK 702/Yıldız	3443	914	26.5	130	14.2	44	4.8	40	4.4	15	25
5	AK 702/Syrena Odeska	2167	1313	60.5	179	13.6	30	2.3	28	2.1	4	24
6	Esperia/ Pandas	3598	670	18.6	83	12.3	20	2.9	19	2.8	2	17
7	Esperia/Sönmez	4431	899	20.2	117	13.0	4	0.4	2	0.2	-	2
8	Esperia / Yunus	240	13	5.4	5	38.4	4	30.7	4	30.7	-	4
9	Esperia / Krasunia	324	20	6.1	4	20	-	-	-	-	-	-
10	Sultan/ Yunus	2813	364	12.9	30	8.2	8	2.2	8	2.2	1	7
11	Sultan/Tosunbey	4314	555	12.8	66	11.9	32	5.7	28	5	8	20
12	Tahirova	2459	386	15.6	32	8.2	7	1.8	6	1.5	2	4
13	Altay	2204	294	13.3	34	11.5	4	1.4	4	1.3	-	4
14	Altay /Tosunbey	4137	506	12.2	62	12.2	32	6.3	31	6.1	8	23
15	Altay / Porsuk	78	7	8.9	-	-	-	-	-	-	-	-
16	Gelibolu / Aldane	1017	77	7.5	15	19.4	-	-	-	-	-	-
17	Bezostaja/Gelibolu	4422	537	12.1	57	10.6	7	1.3	6	1.1	-	6
18	Kıraç / Krasunia	3581	724	20.2	106	14.6	51	7.04	44	6.07	2	42
19	Sönmez / Esperia	3418	817	23.9	78	9.5	6	0.7	5	0.6	1	4
20	Müfitbey / Kadett	2930	627	21.3	77	12.2	5	0.8	5	0.8	-	5
21	Atilla / Konya	180	48	26.6	-	-	10	20.8	9	18.7	-	9
22	Süzen / Konya	1827	250	13.6	24	9.6	-	-	-	-	-	-
23	Konya / Tanya	667	211	31.6	8	3.8	2	0.9	2	0.94	-	2
24	Konya / Batko	721	50	6.9	8	16	3	6	3	6	-	3
25	Konya / Kutluk	944	171	18.1	8	4.6	14	8.1	12	7.01	3	9
26	Tahirova / Konya	1831	88	4.8	22	25	-	-	-	-	-	-
27	Müfitbey / Neepawa	2345	86	3.6	16	18.6	2	2.3	2	2.3	-	2
28	Yubileynaya/Sagittario	661	70	10.5	12	17.1	7	10	6	8.5	-	6
29	Kutluk/ Esperia	1345	121	8.9	24	19.8	1	0.8	1	0.8	-	1
30	Kutluk / Krasunia	774	110	14.2	8	7.2	3	2.7	3	2.7	1	2
31	Y-100 / Katea	1100	39	3.5	2	5.1	-	-	-	-	-	-
32	K-99 / Konya	336	10	2.9	-	-	-	-	-	-	-	-
33	Lastochka / Katea	775	278	35.8	66	23.7	2	0.7	2	0.7	-	2
34	Oksana /AK-702	364	44	12.8	3	6.8	1	2.2	1	2.27	-	1
35	AK-702 / Ronsard	230	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	Sönmez / Tosunbey	3084	366	0.11	48	13.1	11	3	10	2.7	7	3
37	Tosunbey / Sönmez	3116	209	6.7	20	9.5	5	2.4	4	1.9	1	3
38	Tosunbey / Nota	2232	96	4.3	7	7.3	2	2.08	2	2.08	-	2
39	İzgi / Tosunbey	1405	132	9.3	12	9.1	15	11.3	14	10.6	6	8
40	İzgi / Sönmez	2490	245	9.8	58	23.6	4	1.6	4	1.6	-	4
41	Nota / Tosunbey	1376	163	11.8	23	14.1	24	14.7	21	12.8	2	19
42	Harman kaya / Altay	1992	81	4.06	8	9.8	-	-	-	-	-	-
43	Vratsa/Kate(7)	2016	938	46.5	114	12.1	94	10.02	82	8.7	19	63
	//Lib/kuz/3/Vratsa/Kate (8)/4/Tosunbey											
44	Vratsa/Kate(7)	1881	2207	117.3	297	13.4	236	10.6	213	9.6	45	168
	//Lib/kuz/3/Vratsa/Kate (8)/4/Esaua											
45	Vratsa/Kate(7)	3195	1132	35.4	194	17.1	123	10.8	108	9.5	39	69
	//Lib/kuz/3/Vratsa/Kate (8)/4/Aldane											
46	Vratsa/Kate (8)*2//WU GENG 8025 /3/Sönmez	2848	1776	62.3	121	6.8	316	17.8	290	16.3	89	201
47	Vratsa/Kate(8)*2 //WU GENG 8025 /3/Tosunbey	1541	203	13.1	20	9.8	1	0.5	1	0.5	-	1
48	SpillmanHRS/4*Tova-2000(Kırmızı tane) // Aldane	3111	505	16.2	82	16.2	36	7.1	32	6.3	-	32
49	Vratsa / Kate(7) // Lib / kuz / 3 //Vratsa/Kate(8)/4/Ceyhan99	3062	1585	51.7	163	10.2	36	2.27	33	2.08	7	26
50	NX02Y4481WaxyBeyaz/ Sönmez	1869	127	6.7	46	36.2	13	10.2	13	10.2	1	12
51	Bezostaja x Konya	93	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
52	Konya x K-99	918	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TOPLAM		107984	22979		2833		1281		1160		276	884

Bu bitkilerde ploidi düzeyi belirlenerek, haploid ve spontan dihaploid olanlar belirlenerek spontan dihaploid olanlar doğrudan seraya saksılara ekilmiştir. Haploid olan bitkilere colchisin uygulanarak kromozom katlaması yapılmış ve iklim odalarına aktarılmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Özel sektör işbirliği kapsamında yapılan bu çalışmada 61 adet F₂ ekmeclik buğday melezi serada yetiştirilmiş, 9 adet F₂ melezinden başak oluşumu olmadığı için başak alınamamıştır. 52 adet F₂ mezinde oluşan erken-orta univalent (tek çekirdekli) dönemdeki tüm başaklar alınmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen veriler Çizelge 1'de gösterilmiştir. Çizelge 1 de kallus sayıları incelendiğinde; 2,7,11,14 nolu melezlerden ekilen anter sayısı sırasıyla 4922, 4434, 4314, 4137 iken oluşan kallus sayısı 1876,899,555 506'dır. 44 nolu melezden ekilen anter sayısı 1881 iken oluşan kallus sayısı 2207 olmuştur. 8, 15, 21, 32 nolu melezlerden sırasıyla ekilen anter sayısı 240, 78, 180, 336 iken, oluşan kallus sayısı sırasıyla 13, 7, 48, 10 olmuştur. Bu da oluşan kallus sayısının genotipe ve ekilen anter sayısına bağlı olarak değiştiğini göstermiştir. Aynı şekilde rejenere olan bitkicik sayısı, albino bitki sayısı ve oluşan haploid ve spontan diploid bitki sayısı da genotipe ve oluşan kallus sayısına göre değişmiştir. Oluşan 1160 adet bitkicik 276'sı haploid, 884'ü spontan diploid olmuştur. Bu bulgular Cistue et al. (2006) tarafından yapılan çalışma ile desteklenmektedir. Albino bitki rejenerasyon oranının genotiplere bağlı olarak farklılık göstermesi ile ilgili bulgularımız, Li et al. (1988), Abd-EL Maksoud and Bedo (1993) ve Orshinsky and Sadasivaiah (1994) ve Altıntaş ve ark. (2005)'nin bulguları ile uyum içerisindedir. Bitki rejenerasyon oranının genotipe bağlı olarak farklılık göstermesi ile ilgili bulgularımız, Bullock ve Baenziger (1982), Liang ve ark. (1987), Li et al. (1988), Foroghi -Wehr and Zeller (1990), De Buyser et al. (1992), Ghaemi ve ark. (1993), Ghaemi et al. (1995), Saidi et al. (1997) ve Altıntaş ve ark. (2005)'nin bulgularını desteklemektedir.

Sonuç

Kromozom katlaması sonucu ve spontan diploid olarak 860 adet hat elde edilmiştir. Bu sonuçların ışığında, haploid bitki üretiminde başlangıç materyali olarak kullanılacak genotiplerin seçimi oldukça önemlidir. Bu çalışma buğday ıslah programlarında anter kültürü tekniğinin uygulanabileceğini göstermektedir. Elde edilen bu sonuç Hatipoğlu ve ark. (1994)'nin, Bilir ve ark. (2009) ve Korkut ve ark. (2001) sonuçlarıyla uyumludur.

Kaynaklar

Altıntaş S., Hatipoğlu R. ve Genç İ. 2005. Donor bitkilerin yetiştirme koşulları ve anterlere farklı sürelerle soğuk uygulamasının ekmeclik buğdayda haploid bitki rejenerasyonuna etkileri

üzerinde bir araştırma. Türkiye VI. Tarla Bitkileri Kongresi, 5-9 Eylül 2005, Antalya, Cilt II: 679-684.

Bilir Ö., Yorgancılar Ö., Özdemir E., Bolat N., Demir B. ve Yüksel S., 2009. Anther kültürü yöntemi kullanarak kışlık buğday çeşitlerinde kallus oluşumu ve rejenerasyon frekansları. Türkiye VIII. Tarla Bitkileri Kongresi, 19-22 Ekim 2009, Hatay

Bullock W.P., Baenziger P.S., Schaffer G.W. and Bottino P.J. 1982. Anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) F₁'s and their reciprocal crosses. Theor. Appl. Genet., 62: 155-159.

Cistue L., Soriano M., Castillo A.M., Valles M.P., Sanz J.M. and Echavarrı B., 2006. Production of doubled haploids in durum wheat (*Triticum turgidum* L.) through isolated microspore culture. Plant cell reports 25(4): 257-264.

De Buyser J., Henry Y., Lonet P., Hertzog R. and Hepsel A., 1987. Florin: A doubled haploid wheat variety developed by the anther culture method. Plant Breeding, 98:53-56.

De Buyser J., Hachemi-Rachedi S., Lemee M.L., Sejourne S., Marcotte J.L. and Henry Y., 1992. Aneuploid analysis of anther culture response in wheat, Plant Breeding, 109: 339-342.

Ellialtıoğlu Ş., Sarı N. ve Abak K. 2001. Haploid Bitki Üretimi. Bitki Biyoteknolojisi (Doku Kültürü ve Uygulamaları) Ders Kitabı Bölüm 5 (2001): 137-189.

EL-Maksoud M.M.A. and Bedö Z., 1993. Genotypes and genotype x medium interaction effects on androgenetic haploid production in wheat (*Triticum aestivum* L.). Cereal Research Communications (1993): 17-24.

Foroghi-Wehr B. and Zeller F.J., 1990. *In Vitro* microspore reaction of different german wheat cultivars. Theor. Appl. Genet., 79: 77-80.

Ghaemi M., Sarrafi A. and Alibert G., 1993. Influence of genotype and culture conditions on the production of embryos from anthers of tetraploid wheat (*Triticum turgidum*), Euphytica 65: 81-85.

Hatipoğlu R., Genç İ. ve Yağbasanlar T., 1994. Ekmeclik buğday (*Triticum aestivum* L.) ıslahında anter kültüründen yararlanma olanakları üzerinde Araştırmalar. Tarla Bitkileri kongresi Bitki Islahı Bildirileri , İzmir, Cilt II, S:108-11.

Hu D., Tang Y., Yuan Z. and Wang J., 1983. The induction of pollen sporophyt of winter wheat and development of new variety Jinghua no 1. Science Agricultural Sinica, 1:29-35.

- Hu Y., Bao R.R. and Xue X.Y., 1988. The new strain '764' of spring wheat by pollen haploid technique from anther culture. Genetic Manipulation in Crops Newsletter, 4:70-85.
- Hu D., Tang, Y., Yuan, Z. and Wang, J.1983. The induction of pollen sporophyte of winter wheat and the development of the new variety Jinhua no 1..Sci. Agric. Sin 1: 29-35.
- Hussain M., Niaz M., Iqbal M., Iftikhar T. and Ahmad J., 2012. Emasculation techniques and detached tiller culture in wheat x maize crosses. J. Agric. Res 50.1 (2012): 1-19.
- Korkut K.Z., Başer İ., Turhan H. ve Bilgin O.,2001. Yerli ve Yabancı Kökenli Ekmeklik Buğday Çeşit ve Hatlarında Haploid ve Di-haploid Genotiplerin Elde Edilme Olanakları. Trakya Üniversitesi Araştırma Fonu Projesi, TÜAF-232, Tekirdağ.
- Li H., Qureshi J.A. and Kartfia K.K., 1988. The influence of different temperature treatments on anther culture response of spring wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Sci., 57: 55-61.
- Liang G.H., Xu A. and Tang H., 1987. Direct generation of haploids via anther culture, Crop Sci. 27(2), 336-339.
- Ouyang J.W., 1986. Induction of pollen plants in *Triticum aestivum*. Haploids of higher plants in vitro. 26-41.
- Orshinsky B.R. and Sadasivaiah R.S., 1994. Effects of media on embryoid induction and plant regeneration from cultured anthers of soft spring Wheats (*Triticum aestivum* L.) Plant Sci., 102: 99-107.
- Pauk J., Kertesz Z., Beke B., Bona L., Csösz M. and Matuz J., 1995. New winter wheat variety: 'GK Delibab' developed via combining conventional breeding and *in vitro* androgenesis. Cer. Res. Com., 23(3):251-256.
- Saidi, N., Cherkaoui, S., Chlyah, A. and Chlyah, H., 1997. Embryo formation and regeneration in *Triticum turgidum* ssp. *durum* anther culture. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 51: 27-33.
- Snape J.W., 1989. Doubled haploid breeding: Theoretical basis and practical applications. En: Review of advances in Plant Biotechnology 1985-1988-2nd International Symposium on Genetic Manipulation in Crops. Mujeeb-Kazi, A. & L. A. Sitch (Eds). CIMMYT, México D. F. – México e IRRI, Manila – Philippines. Pp 19-30.
- Zhuang J. and Jia X., 1983. Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement. Science Press, Beijing pp. 431-432.